

Abnehmende UV-Licht-Sensibilität des *Malassezia furfur* bei Synthese von Pigmenten aus Tryptophan

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Birgit Hildegard Margarete Pape
aus Paderborn

Gießen 2001

Aus dem Zentrum für Dermatologie und Andrologie
Leiter: Prof. Dr. Dr. med. habil. W. -B. Schill
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: PD Dr. med. Peter Mayser
Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Geyer

Tag der Disputation: 23. April 2002

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. VORWORT | 1 |
| 2. HINTERGRUND UND FRAGESTELLUNG | 2 |
| 2.1. Einleitung | 2 |
| 2.2. Die Pityriasis versicolor | 3 |
| 2.2.1. Klinik | 3 |
| 2.2.2. Inzidenz und Manifestation | 4 |
| 2.2.3. Kontagiosität und Prädisposition | 5 |
| 2.2.4. Pathogenese der Pityriasis versicolor | 6 |
| 2.2.5. Diagnostik | 7 |
| 2.2.6. Therapie und Prognose | 8 |
| 2.3. Krankheitserreger der Pityriasis versicolor | 8 |
| 2.3.1. Die Gattung Malassezia im historischen Überblick | 8 |
| 2.3.2. Epidemiologie des Erregers | 10 |
| 2.3.3. Morphologie | 11 |
| 2.3.4. Stoffwechseleigenschaften | 12 |
| 2.4. Photophysik, Photochemie und Photobiologie | 13 |
| 2.4.1. Grundlagen | 13 |
| 2.4.2. Wirkung von UV-Strahlen auf Mikroorganismen | 13 |
| 2.4.3. Schutzmechanismen von Mikroorganismen gegen UV-Licht | 16 |
| 2.5. Fragestellung | 18 |
| 3. MATERIAL UND METHODEN | 19 |
| 3.1. Referenzstämme | 19 |
| 3.2. Kulturmedien | 20 |
| 3.3. Versuchsaufbau der Untersuchungen | 21 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 3.4. | UVA- und UVB-Exposition | 26 |
| 3.5. | Methoden der Keimzahlbestimmung und Erstellung von Wachstumskurven | 27 |
| 3.6. | Statistische Auswertung | 38 |
| 3.7. | UV-Filter auch für Menschen nutzbar? | 38 |
| 3.7.1. | Gewinnung von Rohextrakt und Pigment aus <i>M. furfur</i> und Nährmedium | 39 |
| 4. | ERGEBNISSE | 40 |
| 4.1. | Medium ohne UV-Bestrahlung | 40 |
| 4.2. | Medium mit UVA-Bestrahlung (einmalig) | 40 |
| 4.3. | Medium mit UVB-Bestrahlung einmalig und kumulativ | 46 |
| 4.4. | Pilzextrakt | 56 |
| 4.5. | UV-Filter bei äußerer Anwendung am Menschen | 57 |
| 5. | DISKUSSION | 59 |
| 6. | ZUSAMMENFASSUNG | 65 |
| 7. | ANHANG | 67 |
| 7.1. | Eichkurve | 68 |
| 7.2. | Meßergebnisse | 69 |
| 7.3. | UV - Spektren des Rohextraktes | 83 |
| 7.4. | Eichkurven - Meßergebnisse aus 7019, 1878, 6046, 4162, 397, und 6094 | 85 |
| 7.5. | Verwendete Geräte und Materialien | 89 |
| 8. | LITERATURVERZEICHNIS | 95 |

| | |
|-----------------------|------------|
| 9. LEBENSLAUF | 107 |
| 10. DANKSAGUNG | 109 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Abbildung 1: graphische Darstellung der Kultivierung von CBS 7019 <i>M. furfur</i> mit Arginin | 23 |
| 2. Abbildung 2: graphische Darstellung der Kultivierung von CBS 7019 <i>M. furfur</i> mit Tryptophan | 23 |
| 3. Abbildung 3 CBS 7019 auf Dixon-Agar mit ARG- bzw. TRP-Zusatz | 24 |
| 4. Abbildung 4: schematische Darstellung des Versuchsaufbaues | 25 |
| 5. Abbildung 5: CBS 7019 - <i>M. furfur</i> nach einer 24 -Std. Trocknung | 34 |
| 6. Abbildung 6: Eichkurve mit Arginin (7019, 1878, 6046, 4162, 397, und 6094) | 37 |
| 7. Abbildung 7: Eichkurve mit Tryptophan (7019, 1878, 6046, 4162, 397, und 6094) | 37 |
| 8. Abbildung 8: CBS 7019 nach UV-Bestrahlung (oben TRP- unten ARG-Zusatz) | 40 |
| 9. Abbildung 9: Graphische Darstellung CBS 7019 - UVA | 42 |
| 10. Abbildung 10: Graphische Darstellung CBS 6046 – UVA | 42 |
| 11. Abbildung 11: Graphische Darstellung CBS 4162 - UVA | 43 |
| 12. Abbildung 12: Graphische Darstellung Wildstamm 397 - UVA | 44 |
| 13. Abbildung 13: Graphische Darstellung CBS 1878 - UVA | 45 |
| 14. Abbildung 14: Graphische Darstellung CBS 6094 - UVA | 46 |
| 15. Abbildung 15: Graphische Darstellung CBS 7019- UVB (einmalig) | 47 |
| 16. Abbildung 16: CBS 7019 - UVB (kumulativ) | 48 |
| 17. Abbildung 17: Graphische Darstellung CBS 6046 - UVB (einmalig) | 49 |
| 18. Abbildung 18: CBS 6046 - UVB (kumulativ) | 49 |
| 19. Abbildung 19: Graphische Darstellung CBS 4162 - UVB (einmalig) | 50 |
| 20. Abbildung 20: CBS 4162 - UVB (kumulativ) | 51 |
| 21. Abbildung 21: Graphische Darstellung Wildstamm 397 - UVB (einmalig) | 52 |
| 22. Abbildung 22: Wildstamm 397 - UVB (kumulativ) | 53 |
| 23. Abbildung 23: Graphische Darstellung CBS 1878 - UVB (einmalig) | 53 |
| 24. Abbildung 24: CBS 1878 - UVB (kumulativ) | 54 |
| 25. Abbildung 25: Graphische Darstellung CBS 6094 - UVB (einmalig) | 55 |
| 26. Abbildung 26: CBS 6094 - UVB (kumulativ) | 55 |
| 27. Abbildung 27: Absorptionswerte des Pilzextraktes | 56 |
| 28. Abbildung 28: Dermis 24 h nach UVB-Bestrahlung mit und ohne Rohextrakt | 58 |
| 29. Abbildung 29: Eichkurve (7019, 1878, 6046, 4162, 397 und 6094) | 68 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Historische Namensgebungen für <i>Malassezia</i> -Hefen (modifiziert nach Ingham 1993) | 10 |
| Tabelle 2: Wirkung von UV-Strahlen auf Mikroorganismen | 15 |
| Tabelle 3: untersuchte <i>Malassezia</i> Stämme | 19 |
| Tabelle 4: (m) Dixon-Agar | 20 |
| Tabelle 5: CBS 7019 <i>M. furfur</i> nach drei-, fünf- bzw. siebentägiger Kultivierung auf (m) Dixon-Agar mit Arginin bzw. Tryptophan | 22 |
| Tabelle 6: Bestrahlungszeit UVA , + bedeutet Wachstum zu verzeichnen, (+) bedeutet sehr wenig Wachstum sichtbar | 29 |
| Tabelle 7: Bestrahlungszeit UVB | 30 |
| Tabelle 8: Bestrahlungszeit UVB kumulativ | 30 |
| Tabelle 9: Unterschiedliche Trockentemperaturen | 31 |
| Tabelle 10: Kulturdauer | 32 |
| Tabelle 11: Anzahl der abgeernteten Inokulatpunkte | 33 |
| Tabelle 12: Eichkurven-Meßergebnisse aus 7019, 1878, 6046, 4162, 397 und 6094 | 35 |
| Tabelle 13: Wellenlänge und Extinktion des Rohextraktes | 57 |
| Tabelle 14: UV-Schutz des auf die Haut aufgetragenen Rohextraktes | 57 |

Liste der verwendeten Abkürzungen

| | |
|----------|---|
| ARG | Arginin |
| AS | Aminosäure |
| CBS | Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, NL |
| CFU | Colony forming units; Kolonie bildende Einheiten |
| LCT | Long chain triglycerids; langkettige Triglyceride |
| M. | Malassezia |
| MCT | Medium chain triglycerids |
| MED | minimale Erythemdosis |
| PV | Pityriasis versicolor |
| R-Gruppe | ”Rest” einer Aminosäure |
| TRP | Tryptophan |

1. Vorwort

Der vorliegenden Dissertationsschrift liegen Untersuchungen zugrunde, die im mykologischen Labor des Zentrums für Dermatologie (Gf. Direktor: Prof. Dr. Dr. med. habil. W.-B. Schill) durchgeführt wurden.

Im Mittelpunkt standen dabei Untersuchungen der UV-Sensibilität von *Malassezia*-Hefen. Dies geschah vor dem Hintergrund der Beobachtung, daß die durch *Malassezia*-Hefen hervorgerufene Erkrankung Pityriasis versicolor zunächst in milchkaffeefarben, kleieförmig schuppenden Maculae besteht. Sie sind zunächst linsengroß, können später unregelmäßig konfluieren und in eine Hypopigmentation übergehen.

Dieses Krankheitsbild ist schon seit über 150 Jahren beschrieben worden, und bislang gibt es kein schlüssiges Modell zu ihrer Pathogenese

Wodurch die charakteristischen Symptome auf der Haut entstehen ist also nicht bekannt. Die vorliegende Arbeit möchte zum Pathomechanismus einige dieser Punkte als Beiträge liefern.

2. Hintergrund und Fragestellung

2.1. Einleitung

Der im Mittelpunkt dieser Untersuchung stehende Organismus ist ein Hefepilz der Spezies *Malassezia (M.) furfur*. Die *M.*-Hefen gehören zur Mikroflora der menschlichen Haut und auch der warmblütigen Tiere (Yarrow 1984, Ingham 1993, Gueho 1996). Sie können zu einer Reihe von Krankheiten, vornehmlich Hauterkrankungen, führen. *Malassezia*-Hefen sind Erreger von Pityriasis versicolor, *Malassezia* - Follikulitis, Kopfschuppen und seborrhoischer Dermatitis. Sie sind auch Auslöser systemischer Infektionen. Die Daten über die Epidemiologie, den Lebenszyklus und die Physiologie des Krankheitserregers der Pityriasis versicolor sind noch nicht vollständig, und die pathogenetischen Zusammenhänge sind noch nicht geklärt (Ingham 1993, Hay 1992).

Das Krankheitsbild der Pityriasis versicolor ist durch polychrome („versicolor“), milchkaffeefarbene und schuppene Hautläsionen gekennzeichnet. Die Maculae können konfluieren und in eine Hypopigmentation übergehen. Unter dem Pilzrasen ist die Haut wesentlich heller als die sie umgebende Epidermis. Unter Sonnenbestrahlung bräunt die umgebende Haut stärker als diejenige, die von Pilzen befallen ist (Balus 1982).

Bereits im Jahre 1801 wurde dieses Krankheitsbild durch Willan erstmals beschrieben, aber die Pathogenese ist bisher noch ungeklärt.

Malassezia-Hefen sind bei bis zu 100% der Bevölkerung auf der Haut nachweisbar (Roberts 1969, Noble 1978). Nur bei bestimmten dafür empfänglichen Personen tritt die Erkrankung auf und bei diesen ist sie meist extrem rezidivfreudig. Diese Neigung wird z.B. durch starkes Schwitzen (Razack 1977) begünstigt.

Es gibt bisher mehrere theoretische Ansätze, die den Pathomechanismus der Hautveränderungen, Hyper- und Hypopigmentierungen, erklären können.

So wurden als Erklärung für die bräunlichen Maculae, die die Pityriasis kennzeichnen, vergrößerte Melanosomen in den betroffenen Hautarealen gefunden (Allen 1972). Dies weist auf eine verstärkte Melaninsynthese hin. Ein Widerspruch dazu ist, daß auch bei der Vitiligo Hyperpigmentierungen beobachtet werden. Bei der Vitiligo ist eine verstärkte Melaninsynthese gar nicht möglich (Dotz 1985), weil diese Erkrankung auf einem autoimmunologisch bedingten Untergang der Melanozyten beruht.

Depigmentierte Areale, die durch die Pityriasis versicolor hervorgerufen werden können, wurden bisher vornehmlich durch zwei Mechanismen erklärt:

1. Physikalisch: durch eine lichtfilternde Wirkung der Schuppen, besonders bei starker UV-Einstrahlung (Lutz 1892, Kistiakovsky 1927, Lewis und Hopper 1936). Gegen dieses Erklärungsmodell spricht, daß die Depigmentierungen auch an unbelichteten Körperstellen auftreten (Jeliffe 1954, Blumenthal 1971) und auch die verzögert einsetzende Repigmentierung (Götz 1962, Rieth 1973), die eher an toxische Einflüsse auf die Melaninsynthese denken läßt.
2. Toxisch: durch eine Hemmung der Dopa-Tyrosinase Reaktion, also einer Hemmung der Melanin bildenden Enzyme (Ruete 1933, Charles 1973, Jung 1976, Bojanovsky 1979). Tatsächlich konnte Azelainsäure, eine C₉-Dicarbonsäure, von Nazarro Porro als Tyrosinaseinhibitor beschrieben werden. Ihre Konzentration in vivo erscheint jedoch als zu gering, um tatsächlich zu einer Hemmung der Melaninsynthese zu führen (Robins 1987).

Erst kürzlich wurde beschrieben, daß *Malassezia furfur* unter Zusatz von Tryptophan zum Nährmedium Pigmente und Fluorochrome synthetisiert und ein braunes Pigment bildet (Mayser und Imkamp 1998). *Malassezia* könnte durch die Tryptophan-induzierte Pigmentsynthese einen potenten UV-Filter aufbauen. Dies könnte eventuell zur Klärung der Pathogenese der Pityriasis versicolor beitragen.

2.2. Die Pityriasis versicolor

2.2.1. Klinik

Bei der Pityriasis versicolor handelt es sich um eine oberflächliche nicht entzündliche chronische Hautmykose mit hoher Morbidität. Es werden grundsätzlich zwei Ausprägungen der Erkrankung unterschieden: die hyperpigmentierte Pityriasis versicolor und die hypopigmentierte Pityriasis versicolor alba (Balus 1982, Hay 1992).

Bei der hyperpigmentierten Pityriasis versicolor entstehen perifollikulär kleine runde oder ovale Maculae (*perifollikuläre Form*). Diese Hautveränderungen können zunehmend größer werden und zu polyzyklischen Flächen konfluieren (*makulöse Form*). Zunächst erscheinen die Veränderungen rötlich bis hellrosa. Dies läßt an einen entzündlichen Beginn denken. Im weiteren Verlauf verändert sich die Farbe der Flecken: Sie werden milchkafeefarben bis braun.

Die Pityriasis versicolor alba beginnt mit der Ausbildung scharf begrenzter, depigmentierter Stellen auf der Haut. Dieses Krankheitsbild tritt bevorzugt bei Sonnenexposition auf, kann allerdings auch an nicht lichtexponierten Körperbereichen auftreten (Bojanovsky 1979).

Unter Sonneneinwirkung können sich zunächst hyperpigmentierte Regionen in hypopigmentierte umwandeln (Lutz 1892, Adamson 1949, Moynahan 1976). Daher hat die Erkrankung ihren Namen "versicolor". Der Zusatz beschreibt den Wechsel der Farbe. Dieses Phänomen wird besonders auf dunkler sonnengebräunter Haut deutlich (Jeliffe 1954, Marples 1965). Manchmal treten beide Stadien, hyperpigmentiert und hypopigmentiert, parallel nebeneinander auf. Am häufigsten ist aber die hyperpigmentierte Form der Pityriasis versicolor.

Die bräunlichen Maculae schuppen sich kleieförmig ab, wenn man mit einem Holzspatel darüber streicht. "Pityriasis" bedeutet "kleieförmige Schuppung". Aufgrund dieser Tatsache wird diese ausgelöste Schuppung auch als "Hobelspanphänomen" bezeichnet.

Die Hautveränderungen (Pigmentierungen und Depigmentierungen) werden von den Patienten oft als kosmetische Beeinträchtigung empfunden. Gerötete entzündlichere Formen gehen hin und wieder mit Juckreiz oder Brennen besonders beim Schwitzen einher (Götz 1962, Borelli 1991, Hay 1992).

2.2.2. Inzidenz und Manifestation

Die tatsächliche Morbidität kann nicht genau beziffert werden. Die Krankheit bleibt oft unbehandelt, weil sie nur selten Beschwerden verursacht und weltweit nicht meldepflichtig ist. Klimatische Faktoren sind für die Entstehung und das Weiterbestehen der Dermatomykose von großer Bedeutung. In den Tropen und Subtropen ist jeder zweite Mensch erkrankt. So beträgt die Inzidenz in Mexiko (Gordon 1951, Gonzales-Ochoa 1956) oder Samoa (Marples 1950) bis zu 50 %, in den gemäßigten Klimazonen (Nord- und Mitteleuropa) dagegen nur 0,5 bis 1 %. Das Maximum der Erkrankung liegt im Mai bis September (Balus 1982).

Manifestationsort ist vorzugsweise der obere Körperstamm, insbesondere der Bereich der seborrhoischen Areale. Der Erreger *M. furfur* ist von einer Versorgung mit längerkettigen Fettsäuren aus den Talgdrüsen der Haut abhängig. In den Tropen sind häufig auch Kapillitium, Gesicht (besonders bei Kindern), Hals und die Beugen der großen Gelenke betroffen (Borelli 1985/1991, B'élec 1991, Terragni 1991). Handflächen und Fußsohlen, frei von Talgdrüsen, sind fast gar nicht besiedelt (Götz 1962, Chetty 1979, El-Hefnawi 1971). Bei

solchen ungewöhnlichen Manifestationen können auch exogen applizierte Lipide eine Rolle spielen (Roed-Petersen 1980).

Manifestationsalter ist gewöhnlich das 2. oder 3. Lebensjahrzehnt (Burke 1961, Marples 1965, Vanbreuseghem 1973, Parisis 1977, McAleer 1980), im Kindesalter sowie nach dem 60. Lebensjahr ist die Inzidenz deutlich geringer (Michalowski 1965). Dies hängt mit der Veränderung der Hautlipide in der Pubertät zusammen (Roberts 1969).

2.2.3. Kontagiosität und Prädisposition

Die Kontagiosität der Pityriasis versicolor ist nicht genau bekannt. Beim Zusammenleben von zwei Personen, von denen der eine an Pityriasis versicolor leidet, wird die Erkrankung nur selten auf die anderen Personen übertragen (Paisis 1977, Vanbreuseghem 1978).

Die experimentelle Auslösung der Infektion erwies sich als problematisch, so daß nicht alle Kriterien für eine Infektionskrankheit erfüllt sind. Burke konnte 1961 bei Patienten mit hohem Cortison-Spiegel eine *Malassezia*-Infektion auslösen. Erst 1981 gelang Faergemann eine experimentelle Infektion bei Gesunden, allerdings unter zusätzlicher Okklusion (Faergemann 1981).

Im Gegensatz zu anderen mykotischen Infektionen ist die Immunantwort erstaunlich gering, obwohl der Erreger das Stratum corneum der Haut dicht besiedelt. Im histologischen Präparat läßt sich nur ein geringes Infiltrat vornehmlich aus T_H-Zellen nachweisen (Scheynius 1984). Auch die humorale Abwehr wird kaum stimuliert, Antikörper der Klasse IgG sind nicht oder nur gering erhöht (Faergemann 1983, Wu 1985).

Es müssen einige Prädispositionsfaktoren hinzukommen, damit sich das gesamte klinische Bild der Pityriasis versicolor zeigt. Zu den ausschlaggebenden Faktoren zählen vor allem ein tropisch-feuchtwarmes Makroklima, bei dem die Erkrankungsinzidenz deutlich ansteigt, aber auch Einflüsse des Mikroklimas. Das Mikroklima wird neben anlagebedingter Hyperhidrose (Razack 1977) auch durch das Tragen okklusiver Kleidung (Hay 1992) sowie Beruf und Freizeitverhalten (Stefanovic 1976, Götz 1980) beeinflusst. Aber auch Tuberkulose und Hyperthyreose sowie schwere Allgemeinerkrankungen mit vermehrter Schweißneigung zählen zu den Prädispositionsfaktoren (Razack 1977).

Weitere Prädispositionsfaktoren sind spontaner oder iatrogener Hyperkortizismus (Canizares 1959, Burke 1961, Boardman 1962, Jung 1963, Roberts 1969), Schwangerschaft sowie Einnahme oraler Kontrazeptiva (Roberts 1969), konsumierende Erkrankungen oder Fehlernährung (Burke 1961, Noble 1981). Aber auch die medikamentöse Immunsuppression

(Burke 1961, Roberts 1969) und die Anwendung lipidhaltiger Externa können zu dem oben beschriebenen Krankheitsbild führen (Marples 1965, Roed-Petersen 1980). Mangelnde Körperhygiene hat keinen Einfluß, denn es wurden Rückfälle trotz sehr gründlicher Körperreinigung beschrieben (Beare 1972, Capetanakis 1971). Auch genetische Faktoren wurden in Betracht gezogen (Burke 1961, 1962/63). In Familien tritt Pityriasis versicolor häufiger bei den Blutsverwandten als bei den übrigen Familienmitgliedern auf (Roberts 1969, El-Hefnawi 1971). Hafez et al. postulierten 1985 eine multifaktorielle Vererbung und fanden eine Häufigkeit von 22,2% bei erstgradigen Verwandten Erkrankter. Auch Zwillingsbeobachtungen lassen an genetische Einflüsse denken (Lynfield 1974).

Die Prädispositionsfaktoren scheinen sehr vielfältig zu sein, sowohl genetische Faktoren, als auch klimatische Faktoren und auch immunsupprimierende Faktoren sind von Bedeutung.

2.2.4. Pathogenese der Pityriasis versicolor

Die Ätiologie der mit der Erkrankung einhergehenden Hyper- bzw. Hypopigmentierung der Haut ist noch nicht vollständig geklärt. Das Krankheitsbild der Pityriasis versicolor alba steht zunächst im Vordergrund. Diese Dermatomykose ist eine Farbvarietät der Pityriasis versicolor. Sie ist durch eine langanhaltende Depigmentierung der Haut charakterisiert. Die kleieförmige Schuppung der Läsionen und die Mikromorphologie der Pilze finden sich bei der hypopigmentierten Form nur noch selten. Die Pityriasis versicolor alba ist die hypopigmentierte Form analog zur hyperpigmentierten Form der Pityriasis versicolor (Adamson 1945, Borelli 1991, Hay 1992). Beide Formen können auch nebeneinander auftreten, aber die hyperpigmentierte Form ist häufiger vertreten. In der Literatur wurden verschiedene Modelle angeboten, die die Hypopigmentierung erklären: 1) Es könnte sich um eine postinflammatorische Hypopigmentierung mit nachfolgendem Leukoderm handeln (Castellani 1913) in Analogie zur syphilitischen Roseola. Es spricht aber dagegen, daß sich histologisch in den Läsionen der Pityriasis versicolor nur wenig Entzündungszeichen und keine Pigmentinkontinenz nachweisen läßt (Ackerman 1997). 2) Es kann sich um ein Pseudoleukoderm als Folge einer rein physikalischen Filterwirkung des Pilzrasens gegenüber ultravioletter Strahlung handeln (Leutz 1892, Kistiakowsky 1927, Wertheim 1928, Lewis 1936). Dagegen spricht, daß die Depigmentierung auch an unbelichteten Körperstellen z.B. Penischaft (Blumenthal 1971, Nia 1979) sowie eine vollständige Depigmentierung auch bei dunkelhäutigen Menschen auftritt (Jeliffe 1945). 3) Aufgrund einer verzögert einsetzenden Repigmentierung könnte man auf eine verzögerte Melaninsynthese rückschließen, die

eventuell durch toxische Einflüsse bedingt ist. Breathnach konnte 1975 ultrastrukturelle Schädigungen der Melanozyten in den Läsionen der Pityriasis versicolor alba feststellen. Oguchi (1982) und ergänzte diese Ergebnisse, indem er einen gestörten Pigmenttransport nachwies.

Interessant ist, daß sich im Biopsiematerial, welches aus weißen Veränderungen einer PV entnommen wurde, die Dopa-Tyrosinase-Reaktion nicht durchführen ließ (Ruete 1933, El-Gathamy 1975). Die Azelainsäure, eine C₉-Dicarbonsäure (HOOC-CCH₂)₇-COOH) ist ein Tyrosinaseinhibitor, der die Reaktion von Dopa zu Dopachinon hemmen kann (Nazzarro-Porro 1978). Die Theorie der Azelainsäure als Agens der Depigmentierung hatte jedoch einige Schwächen: 1. Zur Gewinnung der Substanz mußten die Hefezellen erst zerstört werden. 2. Das Modell von Nazarro-Porro et al. (1978) kann nicht belegen, warum die Pityriasis versicolor alba nicht regelhaft auftritt sobald der Erreger auf der Haut nachweisbar wird, sondern nur unter bestimmten nutritiven Bedingungen, insbesondere bei starkem Schwitzen und hoher Luftfeuchte. 3. Nazarro-Porro et al. können nicht die Farbvarietäten und die Fluoreszenz der hyperpigmentierten Läsionen erklären. Mayser und Wille (Mycoses 1998) konnten in ihren Untersuchungen eine Substanz (wahrscheinlich C₁₈ H₁₄ N₂O) nachweisen, für die mittels enzymkinetischer Tests eine Hemmwirkung auf die Tyrosinase festgestellt werden konnte. Diese Substanz ist sehr lipophil und könnte die Melaninsynthese stören.

Zur weiteren Abklärung der Pathogenese der PV alba dient ein Blick auf die Differentialdiagnose dieses Krankheitsbildes, die Vitiligo (Lockshin 1973, Hay 1992). Bei der Vitiligo treten bedingt durch den autoimmunologischen Verlust der Melanozyten oft Sonnenbrände in den Läsionen auf. Obwohl sich bei der P.V. eine Hemmung der Melaninsynthese durch toxische Einflüsse nachweisen läßt, treten bei der P.v. alba sehr selten Sonnenbrände in den Läsionen auf. Ganz im Gegenteil tritt in der die Läsionen umgebenden Haut eher eine Dermatitis solaris auf (Ruete 1933).

2.2.5. Diagnostik

Die Pityriasis versicolor ist häufig eine Blickdiagnose. Die Diagnose kann durch eine Woodlicht-Untersuchung (UV-Licht mit einer Wellenlänge von 366 nm) und durch ein KOH-Nativpräparat ergänzt werden.

Die Läsionen fluoreszieren im Woodlicht grünlich-gelb. Mit dieser Untersuchung kann die eigentliche Ausdehnung der Läsionen, die z.T. bei Tageslicht kaum sichtbar sind, festgestellt werden (Hay 1992). Aus den sich schuppenden Arealen läßt sich leicht Material für die

mykologische Untersuchung gewinnen. Unter dem KOH-Nativpräparat (zunächst bei 100facher, dann bei 400facher Vergrößerung) zeigen sich runde 2-4µm große Sproßzellen. Dazwischen finden sich unverzweigte Hyphen mit einer Länge von bis zu 20µm (Bojanovsky 1979). Das mikroskopische Bild erinnert dabei an "Spaghetti mit Fleischklöschen".

Eine Kultur ist nicht aussagekräftig. Der Keim zählt zur residenten Hautflora und das Hyphenstadium prägt sich in der Kultur nicht aus. Veränderungen einer Pityriasis versicolor zeigen zwar eine erhöhte Keimdichte (Mc Ginley 1970), als pathogenetisch entscheidend gilt aber die Induktion von Hyphen durch bislang nicht vollständig aufgeklärte Faktoren (Gordon 1951).

2.2.6. Therapie und Prognose

Begonnen wird mit der topischen Therapie. Sie erfolgt zumeist als Intervallbehandlung und ermöglicht eine gute Rezidivprophylaxe. Gut wirksam sind Antimykotika aus der Gruppe der Azole. Es sollte immer der ganze Körper behandelt werden, da das Hyphenstadium auch in nicht-läsionaler Haut erhöht ist.

Auch mit antimykotischer Therapie beträgt die Rezidivrate 60-80 % innerhalb 1-2 Jahren.

2.3. Krankheitserreger der Pityriasis versicolor

2.3.1. Die Gattung *Malassezia* im historischen Überblick

Hefen der Gattung *Malassezia*, Erreger der Pityriasis versicolor und anderer Hauterkrankungen, sind schon seit über hundert Jahren bekannt. Erstmals wurde die Pityriasis versicolor 1801 durch Willan beschrieben. Einige Jahre später, etwa 1846, entdeckte Carl Ferdinand Eichstedt im Schuppenmaterial einer Pityriasis versicolor "Pilzfäden" in reichlichen Mengen. Eichstedt konnte sie aber nicht klassifizieren und gab ihnen keinen Namen. Erst Charles Robin benannte 1853 den Erreger erstmalig *Microsporon furfur*. Er vermutete Ähnlichkeiten zu dem Dermatophyten *Microsporum audouinii* (Robin 1853). Diese Zugehörigkeit zur Gattung *Microsporum* wurde aufgrund der Mikromorphologie des Erregers schon 1892 von H.E.Baillon bestritten. Baillon schuf ein neues Genus "*Malassezia*" und nannte den Pilz zu Ehren des Pariser Pathologen Louis Charles Malassez "*Malassezia (M.) furfur*" (Baillon 1889). Die Bezeichnung für den Erreger hat sich bis heute nicht geändert.

Malassez hatte 1874 Hefe-ähnliche Zellen in Kopfschuppen beschrieben und sie als Sporen bezeichnet (Malassez 1874). Diese Sporen wurden 1904 von Sabouraud mit *Pityrosporum* (Spore der Schuppe) *Malassezii* benannt (Sabouraud 1904). Aufgrund der ovalen Form der

Hefezellen gaben Castellani und Chalmers 1913 diesem Erreger den Namen *Pityrosporum* (*P.*) *ovale* (Castellani 1913).

Gordon entdeckte 1951 eine weitere Hefe auf der Haut: er isolierte runde Hefezellen sowohl von normaler Haut als auch aus Läsionen der Pityriasis versicolor. Gordon vermutete, daß es sich nicht um *M. furfur* handeln könne, da diese Hefe keine Hyphen produziere und auch keine Pityriasis auslösen könne. Er betitelte diesen Pilz aufgrund seiner runden Zellform als *Pityrosporum* (*P.*) *orbiculare*.

Ab 1951 existierten also für über 20 Jahre diese drei Hefespezies: *Malassezia furfur*, *Pityrosporum ovale* und *Pityrosporum orbiculare*.

M. furfur galt als Erreger der Pityriasis versicolor. Die beiden *Pityrosporum*-Spezies galten als Keime, die in einem pathogenen Zusammenhang mit der Pityriasis zu stehen schienen. Das Krankheitsbild Pityriasis versicolor ließ sich durch diese Keime nicht auslösen.

Insbesondere *P. orbiculare* schien das pathogene Agens bei der Pityriasis versicolor darzustellen (Meinhof 1967). Es zeigte sich jedoch, daß beide *Pityrosporum*-Spezies sowohl von gesunder Haut, als auch in Läsionen der Pityriasis versicolor isoliert werden konnten (Kinbara 1980, Faergemann 1979).

Mit seinem typischen Bild von runden Hefezellen und kurzen Hyphen ließ sich *M. furfur* nur direkt im Nativpräparat nachweisen, aber niemals in Kulturen. Die beiden *Pityrosporum*-Spezies waren identisch in Wachstum, Nährstoffbedingungen, Verstoffwechselung von Lipiden und auch in der optimalen Wachstumstemperatur (Caprilli 1973, Nazzaro Porro 1976). Sie ließen sich nur in der Zellform (rund bzw. oval) unterscheiden.

M. Dorn erbrachte 1977 den Nachweis, daß *P. ovale* und *P. orbiculare* unter geeigneten Kulturbedingungen ineinander überführt werden können. *P. orbiculare* war in Kulturen in ovaler Form nachweisbar. Mit der Zugabe von Glycin zum Nährmedium konnte auch eine Hyphenbildung induziert werden (Dorn 1977). Dies war Beweis genug, daß es sich bei *M. furfur* und den beiden *Pityrosporum*-Spezies um einen identischen Erreger handelte. 1986 wurde dies auch von der Internationalen Kommission zur Taxonomie der Pilze anerkannt, und die Hefen erhielten einheitlich den Namen *Malassezia* (Cannon 1986).

Im Jahre 1989 konnte die Identität von *Pityrosporum* mit *M. furfur* durch Genom-Analysen bestätigt werden (Gue'ho 1989). Genom-Analysen bestätigten auch die Existenz einer zweiten *Malassezia* Spezies, *M. pachydermatis*. 1925 beschrieb Weidmann diese Hefe, die er *Pityrosporum canis* nannte und ausschließlich von Hunden isolierte. 1990 wurde eine dritte

Malassezia-Spezies beschrieben, *M.symphodialis* (Simmons 1990). Besonders charakteristisch für diese Spezies ist sympodiale Sprossung. Bei *M.furfur* erfolgt die Sprossung monopolar. Einige Jahre später, 1996, konnten durch weitere Genom-Analysen vier weitere *Malassezia*-Spezies abgegrenzt werden: *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* und *M.slooffiae* (Gue'ho 1996). Diese Einteilung ist noch nicht allgemein anerkannt, weil die Existenz dieser vier Spezies bisher noch nicht durch physiologische Studien abgesichert werden konnte.

Tabelle 1: Historische Namensgebungen für *Malassezia*-Hefen (modifiziert nach Ingham 1993)

| Bezeichnung | Autor | Jahr |
|--------------------------------|------------|------|
| <i>Microsporon furfur</i> | Robin | 1853 |
| <i>Malassezia furfur</i> | Baillon | 1889 |
| <i>Pityrosporum malassezii</i> | Sabouraud | 1904 |
| <i>Pityrosporum ovale</i> | Castellani | 1913 |
| <i>Pityrosporum orbiculare</i> | Gordon | 1951 |

2.3.2. Epidemiologie des Erregers

Der Erreger der Pityriasis versicolor, *Malassezia furfur*, ist schon lange bekannt. *Malassezia*-Hefen treten ubiquitär auf und gehören zur Mikroflora der menschlichen Haut (Yarrow 1984, Ingham 1993). Auf klinisch unveränderter Haut läßt sich der Keim häufig nachweisen, besonders am Kopf (78-97 %) und am Stamm (92-100 %) (Roberts 1969, Mc Ginley 1975, Noble 1978).

Aufgrund ihrer Lipophilie finden sich die *Malassezia*-Hefen vorwiegend in talgdrüsenreichen Arealen. Die Erreger liegen extrazellulär zwischen den Hornzell-Lamellen im Akroinfundibulum, dem oberflächennahen Anteil des Follikels (Wolff 1976).

Die Besiedlung der Haut mit *Malassezia*-Hefen steigt mit zunehmender Talgproduktion an. Im hohen Alter und im Kindesalter reduziert sich die Keimzahl, weil die Talgproduktion abnimmt. Die Aktivität der Talgdrüsen steigt bei Eintritt der Pubertät, so daß sich in diesem Alter besonders hohe Keimzahlen nachweisen lassen.

Aufgrund der Tatsache, daß die Hefezellen sich nicht gleichmäßig über die Hautoberfläche verteilen, sind Aussagen über die Dichte der Besiedlung nur schwer zu treffen. Auf normaler unveränderter Haut wird die Erregerzahl mit 10000 - 35000 Erregern/cm² angegeben. Bei der Pityriasis versicolor steigt die Zahl jedoch bis auf 45000 Keime/cm² an (Wolff 1976). Die

Keimbesiedlung ist also sehr hoch und spricht für die Pathogenität der *Malassezia*-Hefen. Der Pathomechanismus ist aber unbekannt.

2.3.3. Morphologie

Nach Kultivierung auf lipidhaltigem Dixon-Agar sind die Kolonien cremefarben-gelblich. Sie haben einen fruchtig-hefigen Geruch, für den γ -Decalactone verantwortlich sein sollen (Labows 1975).

Lichtmikroskopisch sind die Hefezellen von runder oder ovaler Form. Es werden Übergänge zwischen den Formen beobachtet, z.T. abhängig vom Nährmedium (Gordon 1951, Roberts 1969, Sloof 1970, Salkin 1977). Es finden sich allerdings ebenso stabile Varianten (Roberts 1969, Midgley 1989, Cunningham 1990).

Die Zellwand dieser Zellen erscheint doppelt konturiert. Runde Zellen sind etwa 2-3 μm im Durchmesser, die ovalen Zellen können bis zu 6 μm lang sein. Dabei lagern sich die Zellen meist dicht wie nestförmig, zusammen. Außen herum sind um diese "Nester" kurze Hyphenelemente gelagert.

Typischerweise findet sich dieses Bild des Dimorphismus bei Nativpräparaten aus akuten Krankheitsläsionen. Die Reproduktion ist bei allen Formen asexuell. Die Zellen bilden Knospen, die sich aus der Mutterzelle hervorstülpen. Dadurch erhalten die Zellen eine typische Flaschenform (Barnes 1973).

Mit dem Elektronenmikroskop erkennt man, daß die Zellwand (ca 0,12 μm) aus mehreren Schichten besteht. Die innerste elektronendurchlässige Schicht der Zellwand weist Furchen auf, die spiralförmig auf der inneren Oberfläche entlangziehen. Der Zellinnenraum ist ausgefüllt vom Protoplasma, welches vom Plasmalemm abgegrenzt wird. Das Plasmalemm stülpt sich in die Furchen der inneren Zellwand hinein. Der mehrschichtige Zellwandaufbau vermittelt den Hefen hohe mechanische Stabilität und Osmotoleranz (Brotherton 1967).

Im Zellinneren kann man unterschiedliche Zellorganellen abgrenzen. Vermutlich handelt es sich hier um endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat. Außerdem sind Vesikel, die wahrscheinlich Lipide enthalten, erkennbar (Kreger-van Rij 1970).

Die Tochterzellen entstehen durch monopolare (*M. furfur*) oder sympodiale (*M. sympodialis*) Sprossung. Die Mutterzelle elongiert, und eine Tochterzelle schnürt sich ab. Diese Abteilung erfolgt an immer derselben Stelle, so daß hier bei der Mutterzelle eine Narbe bestehen bleibt, die "collarett" genannt wird (Kreger-van Rij 1970, Slooff 1970, Simmons und Guého 1990).

Der *Malassezia*-Pilz wird zu den Basidiomyceten gerechnet. Dies liegt im Aufbau der Zellwand begründet und darin, daß er eine positive Diazonium-blau-Reaktion zeigt (Kwon-Chung 1992).

2.3.4. Stoffwechseleigenschaften

Lange Zeit konnte *Malassezia* nur schwer angezüchtet werden. Erst nachdem R.W.Benham 1939 die obligate Lipiddependenz des Erregers erkannte (Benham 1939), war es möglich, Kulturen anzuzüchten und gezielt den Stoffwechsel, insbesondere den Fettstoffwechsel, zu untersuchen. Für die Anzüchtung konnte dabei entweder ein herkömmliches Medium (z.B. Sabouraud-Dextrose-Agar) verwendet werden, das mit einem Lipid (Olivenöl) überschichtet wurde, oder es wurde ein Spezialnährboden wie Dixon-Agar (van Abbe 1964) verwendet. Hier sind Lipide direkt im Nährboden enthalten. Es zeigte sich, daß die Hefe von der Zufuhr längerkettiger Fettsäuren abhängig ist. Der Pilz wandelt die ihm zugeführten Fettsäuren um und produziert seinerseits Fettsäuren höherer Kettenlänge (Shifrine 1963). Am besten verstoffwechselt er freie Fettsäuren (gesättigt oder ungesättigt). Auf der menschlichen Haut kann er hiermit gut überleben, denn die Hautoberflächenlipide bestehen bis zu 20 % aus freien Fettsäuren (Schürer 1993).

Außer der obligaten Lipiddependenz ist bisher wenig über die Wachstumsbedingungen von *M.-Hefen* bekannt. *M. furfur* ist ein sehr anspruchsloser und optimal an die Wachstumsbedingungen der oberflächlichen Hautschichten, insbesondere den seborrhoischen und mit Schweißdrüsen ausgestatteten Arealen, adaptierter Keim. Er weist eine hohe Osmotoleranz (Brotherton 1967) und ein pH-Optimum von 5,5 (Yarrow 1984) auf. *M. furfur* wächst im Vergleich zu allen anderen *Malassezia* Spezies auf einem Minimalmedium, das nur aus Aminosäuren bzw. anderen Aminostickstoffquellen sowie aus Lipidquellen besteht.

Kohlenhydrate, Vitamine, Elektrolyte und Spurenelemente sind nicht erforderlich. Unverzweigte Aminosäuren (Alanin, Serin, Glycin, Arginin) werden sehr gut metabolisiert. Verzweigte (Valin, Leucin, Isoleucin), aromatische (Tyrosin, Phenylalanin) und heterozyklische Aminosäuren (Tryptophan, Histidin, Prolin) werden weniger gut verstoffwechselt. Serin, Glycin und Alanin werden von *M. furfur* am besten verwertet. Diese Substanzen sind im ekkrinen Schweiß enthalten, genauso wie andere Stickstoffquellen (Kreatinin, Kreatin, Harnstoff und Harnsäure). Auch die Zellmorphologie ist von den verstoffwechselten Aminosäuren abhängig. Es kommen lange, ovale, kettenförmige,

monopolare Knospungen, Keimschläuche, Myzelfäden und Hyphen vor. In vivo treten aber nur Mischformen auf, weil alle Aminosäuren nebeneinander vorhanden sind (Mayser u. Imkamp 1998).

2.4. Photophysik, Photochemie und Photobiologie

2.4.1. Grundlagen

Experiment und Klinik zeigen, daß Strahlung, die von biologischen Molekülen absorbiert wird, photochemische Veränderungen bewirken kann. Diese lassen sich an der DNA am deutlichsten nachweisen. Bei Überforderung der Reparaturmechanismen können Fehler auftreten, welche die lebensnotwendigen Funktionen der Zellen verändern. Durch Absorption der eingestrahlten Photonen kommt es an definierten Stellen der DNA zur Energieabsorption und damit zur Anregung von Elektronen. Daran können sich komplexe biochemische Prozesse anschließen (Proliferation, Mutation, Toxizität).

Die Strahlenwirkung kann man grob in drei Phasen unterteilen (Fitzpatrick 1993):

Photophysik: Biologische Moleküle absorbieren Strahlung. Dies führt zu Veränderungen der Elektronenhülle des Moleküles. Jedes Molekül absorbiert entsprechend seinem chemischen Aufbau nur Strahlung einer bestimmten Wellenlänge. Daran erkennt man sein Absorptionsspektrum.

Photochemie: Hierunter versteht man Veränderungen der chemischen Struktur eines Moleküls, nachdem es Strahlung absorbiert hat bzw. nach Energieübertragung eines Nachbarmoleküls.

Photobiologie: Die chemischen Strukturveränderungen von Molekülen ziehen Veränderungen der Nukleinsäuren sowie Eiweißdenaturierungen nach sich. Die Haut eignet sich als Beispiel (siehe Erythem und Sonnenbrand).

2.4.2. Wirkung von UV-Strahlen auf Mikroorganismen

Die durch UV - Licht hervorgerufenen Schäden an Nukleinsäuren des Zellkernes sind bei Mikroorganismen wie Bakterien und Pilzen weitgehend erforscht. Angriffspunkt des Strahlenreizes ist die Zelle. Kleine Dosen wirken tendenziell anregend, mittlere Dosen hemmend und hohe Dosen zerstörend. Der Zellkern reagiert am empfindlichsten auf UV -

Licht. Die Eiweißquellen des Zellkernes und auch die des Zytoplasmas denaturieren. Dies führt zum Nachlassen der Enzymaktivitäten, was letztendlich zu einer Verlangsamung des Stoffwechsels, des Wachstums und der Motilität der Zelle führt. Kariorrhesis und Anomalien der Zellteilung sowie Koagulationsnekrosen des Kernes sind beschrieben. (Ellinger 1935, Kap. 1 S. 5-9; Meyer 1949; Kap. 4 S.225 und 253). Auch Ribosomen, Lysosomen, und Mitochondrien, werden geschädigt (Fitzpatrick 1993, Kap. 130 S.1631). Hefen und Schimmelpilze erfahren durch UV-Licht zuerst eine anregende Wirkung. Bei größeren Dosen werden sie abgetötet. In der Praxis wird dieser Abtötungseffekt zur Entkeimung von Flüssigkeiten und Luft genutzt (Meyer 1949, Kap. 4 S. 254-257). UVB - Licht ist stärker wirksam als UVA - Licht, weil es einen höheren Energiegehalt aufweist. So wurden Pilze der Gattung *Malassezia* auf Dixon - Platten aufgeimpft, einmalig mit unterschiedlichen Dosen UVA (Wellenlänge 360 nm) (25, 50, 75 J / cm²) und UVB (315 nm) (65, 123, 250, 900 mJ / cm²) bestrahlt und nach 3 Tagen Anzucht elektronenmikroskopisch untersucht. Bei einer Bestrahlungsstärke von 900 mJ / cm² UVB sowie bei Bestrahlung mit UVA mit 25, 50 oder 75 J / cm² konnte man eine starke bzw. sogar eine vollständige Wachstumshemmung feststellen. Elektronenmikroskopisch konnte man Verklumpungen der Ribosomen und degenerative Veränderungen der Zellkerne erkennen, wohingegen die Zellwände völlig unverändert waren (Wikler 1990).

An *E. coli* ist nachgewiesen worden, daß 10^4 - 10^5 mal mehr UVA (365 nm) nötig ist, um den gleichen Effekt zu erzeugen wie bei kürzeren Wellenlängen. Es kommt auch beim UVA zu Zelldefekten und Veränderungen im metabolischen System. UVA beschädigt einerseits die Nukleinsäuren direkt und andererseits hemmt es die Reparatursysteme (Parrish 1981, Kap. 5 S.96-99).

An Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*), Pilzen (*Neurospora crassa*) und an Protozoen (*Paramecium aurelia*) sind nach Bestrahlung mit ultravioletem Licht vermehrt Mutationen aufgetreten, die oft zum Untergang der Zellen geführt haben (Wang 1976, Kap. 8 S.364-367). Mutationen können den Zellen aber auch einige Vorteile bringen, vor allem im Hinblick auf die Evolutionsgeschichte.

Das Aktionsspektrum von Bakterien liegt im Absorptionsspektrum der DNA und RNA. Es liegt im Bereich des UVB und UVC.

Faergemann konnte bereits 1986 zeigen, daß viele verschiedene Mikroorganismen, die aber alle zur Standardflora der menschlichen Hautoberfläche zählen, auf UVA- oder UVB-Exposition mit einer Wachstumsreduktion reagierten. *Pityrosporum orbiculare* reagierte aber

im Vergleich zu den anderen untersuchten Organismen wie *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* auf UV-Licht am empfindlichsten. Der diesen Versuchen zugrundeliegende UVB-Bereich lag bei 65, 123, 250 und 900 mJ cm⁻². Gegenüber der unbelichteten Kontrolle (2500 Zellen) verringerte sich das Wachstum bei 65 mJ cm⁻² auf 320 und bei 123 mJ cm⁻² auf 100 Zellen. Bei 250 bzw. 900 mJ cm⁻² war kein Wachstum mehr zu verzeichnen. In dem den Versuchen zugrundeliegendem UVA-Bereich (25, 50, 75 J cm⁻²) wurde nur das Wachstum von *P. orbiculare* sichtbar gehemmt.

Rivers führte 1988 in vivo eine Doppelblindstudie mit *M.*-Hefen durch. Die Kontrollgruppe wurde sichtbarem Licht (31 J cm⁻²) ausgesetzt, und die anderen wurden mit UVA-Licht mit einem geringen Anteil UVB bestrahlt, insgesamt (34 J cm⁻²).

Die Zahl der *Malassezia*-Hefen (*Pityrosporum ovale* und *orbiculare*) war nach der UV-Exposition in der Kontrollgruppe von 5077 auf 2641 Zellen und in der anderen Gruppe von 4281 auf 2374 gefallen. Es läßt sich also aufgrund der oben geschilderten Tatsachen schlußfolgern, daß die *Malassezia* *spezies* sehr empfindlich auf UV-Licht reagiert. Ein UV-Filter könnte für die Mikroorganismen einen großen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Organismen nach sich ziehen.

Tabelle 2: Wirkung von UV-Strahlen auf Mikroorganismen

| Mikroorganismus | Autor/Jahr | Auswirkung von UV-Strahlen |
|--|---|--|
| Pilze, Hefen | Ellinger /1935 Meyer /1949 Fitzpatrick/ 1993 | Schädigung von Zellkern, Ribosomen, Lysosomen und Mitochondrien führen zu Eiweißdenaturierung, Nachlassen der Enzymaktivitäten sowie Verlangsamung des Stoffwechsels, der Motilität und Wachstum der Zelle |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>Paramecium aurelia</i> | Wang /1976 | UV-Strahlung führt zu vermehrtem Auftreten von Mutationen |
| <i>E.coli</i> | Parrish /1981 | UVA schädigt die Nukleinsäuren und hemmt die Reparatursysteme der Zelle |
| Standardflora menschl. Haut | Faergemann/ 1986 | <i>Pityrosporum orbiculare</i> reagierte im Vgl. zu den anderen Organismen wie <i>Candida albicans</i> , <i>Staph.</i> |

| | | |
|---------------------------|-------------|---|
| u.a. <i>P. orbiculare</i> | | <i>aureus</i> und <i>Staph. epidermidis</i> auf UV-Strahlung am empfindlichsten |
| <i>Malassezia</i> -Hefen | Rivers/1988 | UVA- und UVB-Strahlung hemmen die Hefen in ihrem Wachstum |
| <i>Malassezia</i> | Wikler/1990 | elektronenmikroskopisch sichtbare Verklumpungen der Ribosomen, Auflösen der Zellkerne; Zellwände bleiben unverändert |
| menschliche Epidermis | Burg/1992 | Schädigung der Keratinozyten, Melanozyten, Fibrozyten, Endothelzellen und Fettzellen |

2.4.3. Schutzmechanismen von Mikroorganismen gegen UV-Licht

Die Haut ist ein Barriereorgan und als solches einer Vielzahl von Mutagenen ausgesetzt. Die UV-Strahlung ist ein sehr potentes Mutagen mit großer klinischer Bedeutung für den Dermatologen (Hauttumoren). Hyperkeratose und Verbreiterung der Epidermis, Melaninproduktion sowie Mechanismen zur Reparatur der DNS-Schäden machen den natürlichen Lichtschutz der Haut aus. Die UV-Strahlung dringt kaum über die Haut hinaus weiter in den Körper ein. Besonders betroffen sind Keratinozyten, Melanozyten, Fibrozyten, Endothelzellen und Fettzellen (Burg 1992 S.17 und 18).

Die Dicke der Dermis in den einzelnen Körperregionen variiert stark, insofern ist die Durchlässigkeit der ultravioletten Strahlung in den verschiedenen Regionen auch unterschiedlich. Körperregionen mit dickem Stratum corneum (Fußsohlen und Handinnenflächen) reagieren kaum auf UV-Licht. Je größer die Wellenlänge der Strahlung desto geringer ist der Energiehaushalt der Strahlung und umso tiefer dringt die Strahlung in die Dermis ein (UVA: 5 mm tief bis zur Subcutis und UVB: 0,3 mm und UVC: 0,01 mm tief) (Moschella 1992, Kap. 22, S.508 und 509). Um 280 nm (UVB) liegt das Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäuren der Keratinozyten. Obwohl nur ein kleiner Prozentsatz der Wellenlängen im Bereich 280-320 nm (UVB) die Dermis erreicht, ist der biologische Effekt dieser relativ kleinen Energiemengen nicht zu vernachlässigen. Wellenlängen zwischen 320-400 nm (UVA) zeigen einen geringeren photobiologischen Effekt (Fitzpatrick 1993, Kap. 130).

Melanin schützt die Haut besonders effektiv vor chronischer und akuter Sonnenbestrahlung. Das unpigmentierte Stratum corneum läßt mehr Strahlung durch als das pigmentierte. Der

Schutz ist beinahe direkt proportional zum Maß der Melanisierung. Der Schutzeffekt resultiert in der Möglichkeit des Melanins, Strahlung im UV-, sichtbaren und infraroten-Bereich zu absorbieren. Im UV-Bereich ist die Absorption stärker als im sichtbaren Bereich (Parrish 1983, Kap. 4 S.61-76; Regan 1982, Kap. 6 S.152-179).

Bei Stimulierung der Melanozyten kommt es nachfolgend zur Pigmentierung der Haut. UVA-Licht bewirkt eine sofortige aschgraue bis bräunliche Pigmentierung der Haut (Sofortpigmentierung), wohingegen UVB zur Spätpigmentierung (kupfer-kaffeebraun) der Haut führt. UVA hat zwar eine geringere Pigmentierungswirkung als UVB, aber der Anteil des UVA im Sonnenlicht ist höher. Aus diesem Grund kommt es auch unter natürlichen Bedingungen zur Melaninbildung. UVB bewirkt eine Melanogenese in der gesamten Epidermis, wohingegen UVA nur in den basalen Epidermisschichten zur Pigmentierung führt. Längere Lichteinwirkung führt sowohl zur vermehrten Melaninbildung (Hyperpigmentierung) als auch zur Verdickung der Hornschicht (Lichtschwiele). Aber nur UVB bewirkt diese Lichtschwiele. UVB bewirkt also insgesamt einen besseren Schutz, weil die Pigmentverteilung über die gesamte Epidermis verteilt ist und zusätzlich eine Lichtschwiele existiert (Braun-Falco 1997, Kap. 13).

Wie im folgenden dargestellt haben sich auch die auf der menschlichen Haut lebenden Mikroorganismen analog zu *M. furfur* an eine verstärkte UV-Exposition adaptiert. *Herpotrichiellaceae* und *Pleosporaceae* zählen zu den *Ascomyceten* und können zum Krankheitsbild der Phaeohyphomykosen führen (Hoog 1995; Polak 1990). Diese Krankheitserreger bilden über Dihydroxynaphatalen und ein verwandtes Pentaketid Melanin (Taylor 1987). Aufgrund ihrer ständigen dunkel-schwarz-braunen Pigmentierung werden sie "Dematiaceen" (Schwärzepilze) genannt.

Neben den Schwärzepilzen synthetisieren noch weitere Mikroorganismen Melanin. Zu erwähnen ist *Filobasidiella neoformans*, besser als Anamorphe *C. neoformans* bekannt. Es gehört zu der Klasse der *Heterobasidiomyceten* und benutzt Phenoloxidasen zur Melaninproduktion (Polachek 1988). Melanin verstärkt ihre Pathogenität und schützt sie vor UV-Licht (Wang 1994). Die Melaninsynthese ist aber abhängig von den Nährstoffbedingungen. Die Studie zeigt, daß melanisierte *C. neoformans*- Kulturen bei 10000 bzw. 20000 mJ cm⁻² UV-Licht (254 nm) den nicht melanisierten Zellen in der Zellzahl überlegen waren. Die erwähnten Mikroorganismen sind auf Dopa und andere Phenole angewiesen. Nur dann ist eine kontinuierliche Melaninsynthese gewährleistet (Polachek 1982).

2.5. Fragestellung

Vor dem oben beschriebenen Hintergrund erscheint es sinnvoll, zu überprüfen, warum *Malassezia furfur* bei Zusatz von Tryptophan zum Kulturmedium ein braunes Pigment synthetisiert.

Im Rahmen dieser Dissertation soll daher untersucht werden, wie stark das Wachstum des Pilzes unter Zusatz von verschiedenen Aminosäuren zum Nährmedium und gleichzeitiger UVA- bzw. UVB-Bestrahlung eingeschränkt wird.

Als Kontrolle dienten Pilze, die unter denselben Nährstoffbedingungen aber ohne UV-Bestrahlung aufwuchsen. Im einzelnen sollten dabei folgende Fragen beantwortet werden.

- Sind die untersuchten Referenzstämme in der Lage, aus Tryptophan einen wirksamen UV-Filter aufzubauen ?
- In welchem UV-Bereich wirkt der UV-Filter ?
- Sind rein lichtmikroskopisch Unterschiede zwischen bestrahlten und nicht bestrahlten Organismen erkennbar ?
- Welcher Art ist der Lichtfilter- physikalisch oder chemisch ?
- Reagieren alle Referenzstämme gleich ?
- Welche Bedeutung hat die erhöhte UV-Resistenz für die Mikroorganismen und für das Krankheitsbild der Pityriasis versicolor ?
- Schützt das Pigment auch den nicht an Pityriasis versicolor-Erkrankten vor UV-Licht, und welche Schlußfolgerungen kann man daraus ziehen ?

3. Material und Methoden

3.1. Referenzstämme

In den Untersuchungen, die dieser Arbeit zugrundeliegen, wurden die in der Tabelle 3 aufgelisteten *Malassezia* Referenzstämme und ein Wildstamm verwendet. Die Referenzstämme wurden beim Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands (CBS) käuflich erworben. Sofort nach Erhalt wurden die Referenzstämme kryokonserviert, um immer auf den definierten Referenzstamm zurückgreifen zu können. Bei dem Wildstamm handelt es sich um Untersuchungsmaterial (Hautschuppen) eines Patienten aus der Poliklinik der Hautklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen. Nach sorgfältiger Hautdesinfektion wurden die Schuppen mit einem sterilen Skalpell von der Hautoberfläche gewonnen, auf Selektivagar für pathogene Pilze (Merck, Darmstadt, FRG) verimpft und mit kaltsterilisiertem Olivenöl (Pharmazeutenqualität, Apotheke Klinik der JLU Gießen) überschichtet. Einmal wöchentlich wurden die Pilze auf modifiziertem Dixon-Agar kultiviert. Als Kontaminationskontrolle (Wachstum nicht lipiddependenter Verunreinigungen-Bakterien, Hefen) wurde Kimmig-Agar (s.u.) mitgeführt.

Tabelle 3: untersuchte *Malassezia* Stämme

| Gattung | Spezies | Stamm | Herkunft |
|-------------------|--------------------|-------------|-----------------------|
| <i>Malassezia</i> | <i>M. furfur</i> | CBS 1878 T | Kopfschuppen |
| <i>Malassezia</i> | <i>M. furfur</i> | CBS 7019 NT | Pityriasis versicolor |
| <i>Malassezia</i> | <i>M. furfur</i> | CBS 6046 | Pityriasis versicolor |
| <i>Malassezia</i> | <i>M. furfur</i> | CBS 6094 | unveränderte Haut |
| <i>Malassezia</i> | <i>M. furfur</i> | CBS 4162 | Schweineohr |
| <i>Malassezia</i> | <i>M. furfur</i> * | 397 | Pityriasis versicolor |

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands

T: Type - strain, NT: Neo - Type strain; *Wildstamm, isoliert von einem an Pityriasis versicolor erkrankten Patienten der Poliklinik des dermatologischen Zentrums der Universitätsklinik Gießen

3.2. Kulturmedien

Die Dauerkultur aller Stämme erfolgte bei 32°C auf modifiziertem (m)Dixon - Agar (Gueho 1996, Guillot 1997). Einmal wöchentlich wurden die Hefen auf frisch zubereiteten Agar weiterverimpft.

Modifizierter Dixon - Agar

In der vorliegenden Arbeit wurde modifizierter (m) Dixon - Agar (Tabelle 4) verwendet. Dieses Kulturmedium setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

3,6 % Malzextrakt, 0,6 % Pepton, 2 % getrocknete Ochsen-galle, 1% Tween 40, 0,2 % Glycerol, 0,2 % Ölsäure, 1,2 % Agar, Aqua dest. auf 100 %

Tabelle 4: (m) Dixon-Agar

| für 250 ml | | |
|--|---|--|
| 3,6 % Malzextrakt | 9 g | Merck, Darmstadt, FRG |
| 0,6 % Pepton (Casein) bzw. | 1,5 g | Pepton aus Casein, Merck |
| Arginin(28,5 mMol) oder Tryptophan (23,3 mMol) | 1,5 g | Sigma, St. Louis USA |
| 2 % Ochsen-galle | 5 g | Difco, Detroit, USA |
| 1 % Tween 40 | 2,5 ml | Tween 40 Atlas, Sigma St. Louis USA |
| 0,4 % Olivenöl | 1 ml | kalt sterilisiert |
| 1.2 % Agar (Aq. Dest. auf 100 %) | 5 g | Agar Agar reinst, Merck |
| 0,04 % Cycloheximid | 0,1 g | Sigma-Aldrich, Steinheim, FRG |
| 0,005 % Chloramphenicol | 0,0125 g**auf 250 ml mit Aq.dest. auffüllen | Merck, Darmstadt, FRG |

** Die Stammlösung besteht aus: 6,25 mg Chloramphenicol / 1 ml H₂O und wurde sterilfiltriert abgefüllt und bei -20°C gelagert; 2 ml der Stammlösung wurden zugegeben

Aus Kostengründen wurde dem hier verwendeten (m)Dixon - Agar 0,4 % Olivenöl statt Glycerol und Ölsäure zugesetzt. Zur Verringerung des Kontaminationsrisikos wurden Chloramphenicol und Cycloheximid hinzugefügt. Die einzelnen Lösungen wurden steril filtriert und dem Medium nach Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50°C zugesetzt, da beide Substanzen temperaturempfindlich sind (Merck Index 1996). Autoklavieren erfolgte mit dem Melag Autoklaven Typ 23 (Melag, Berlin, FRG) bei 1 bar über 30 min..

Jeweils 10 ml des Mediums wurden unter einer Laminar-air-flow Arbeitsbank (Uniflow UUUB 1200, Biohazard) in sterile Kunststoffpetrischalen von 10 cm Durchmesser (Nunc, Roskilde, DK) gegossen.

Pilz-Agar nach Kimmig (Merck, Darmstadt, FRG)

Zusammensetzung für 1l: Glukose 19,0 g, Pepton e carne 15,0 g, NaCL 1,0 g, Glycerin 5,0 ml, Agar-Agar 15,0 g.

Kimmig-Agar wurde zum Ausschluß einer Kontamination der lipophilen *Malassezia*-Hefen eingesetzt.

3.3. Versuchsaufbau der Untersuchungen

Die Referenzstämme von *Malassezia furfur* sowie ein Wildstamm wurden auf Dixon-Agar sechs Tage lang angezüchtet. Die Stickstoffquelle Pepton wurde entweder durch Arginin (Konz. 6g/l) oder das Pigment - induzierende Tryptophan (Konz. 6g/l) ersetzt. Anschließend wurden die Hefezellen abgeerntet (s.u.) und auf Dixon-Agar (mit Pepton) weiterverimpft (s.u.). Zur Gewährung gleicher Wachstumsbedingungen wurden auf Tryptophan- bzw. Arginin angezüchtete Pilze auf dieselbe Nährbodenplatte aufgetragen, unten die von Arginin, oben die von Tryptophan.

Unmittelbar danach wurden die Pilze mit UVA bzw. UVB (einmalig bzw. kumulativ) bestrahlt. Die UVA-Bestrahlung fand nur einmalig bei 100, 150 und 200 J/cm² statt. Die UVB-Bestrahlung wurde jeweils einmalig bei 100, 500, 1000, 1500 und 2000 mJ/cm² bzw. mehrmalig bei 100, 300 und 500 mJ/cm² durchgeführt. Die Kontrollplatten wurden nicht bestrahlt. Dann wurden die Agarplatten verschlossen und bei 32°C inkubiert. Nach fünf Tagen wurden die Kolonien nach ihrem Aussehen und ihrer Konsistenz beurteilt, anschließend abgeerntet und in einem Trockengerät getrocknet. Das Wachstum der Hefen wurde über die Bestimmung des Trockengewichtes der Kolonien berechnet. Die absolute Zellzahl wurde an

einer Standarddeichkurve, die Gewicht und Zellzahl jedes Stammes und Aminosäure (Arginin und Tryptophan) enthielt, abgelesen.

Die Zellmorphologie der bestrahlten und nicht bestrahlten Pilze wurde mit einem Phasen-Kontrast-Mikroskop (Dialux, Leitz, Wetzlar, Germany) bei 120facher, dann bei 480facher Vergrößerung beurteilt.

Die Stickstoffquelle Pepton wurde in gleicher Menge (mg Gewicht) entweder durch Arginin (Sigma) oder das pigmentinduzierende Tryptophan (Sigma) ersetzt. Arginin wurde unter allen Aminosäuren ausgewählt, weil die damit ohne Belichtung erzielbaren Wachstumsraten denen mit Tryptophan vergleichbar waren (Generationszeit 19 h). Dies wird bei CBS 7019 *M. furfur* als Beispiel für alle verwendeten *Malassezia*-Stämme anhand einer Tabelle (Tabelle 5) und der Abbildungen (Abbildung 1, Abbildung 2) graphisch dargestellt.

Tabelle 5: CBS 7019 *M. furfur* nach drei-, fünf- bzw. siebentägiger Kultivierung auf (m) Dixon-Agar mit Arginin bzw. Tryptophan

CBS 7019 nach dreitägiger Kultivierung:

| CBS 7019 | mg | mg | Mittelwert (mg) | Mittelwert (Mio.) |
|------------|------|------|-----------------|-------------------|
| Arginin | 2,08 | 1,99 | 2,04 | 100 |
| Tryptophan | 2,05 | 1,98 | 2,0 | 100 |

CBS 7019 nach fünftägiger Kultivierung:

| CBS 7019 | mg | mg | mg | mg | mg | mg | mg | mg | Mittelwert (mg) | Mittelwert (Mio.) |
|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----------------|-------------------|
| Arginin | 3,15 | 3,23 | 3,18 | 3,2 | 3,08 | 3,19 | 3,14 | 3,28 | 3,1813 | 158 |
| Tryptophan | 3,2 | 3,4 | 3,22 | 3,14 | 3,11 | 3,21 | 3,27 | 3,35 | 3,2375 | 159 |

CBS 7019 nach siebentägiger Kultivierung:

| CBS 7019 | mg | mg | Mittelwert (mg) | Mittelwert (Mio.) |
|------------|------|------|-----------------|-------------------|
| Arginin | 3,26 | 3,35 | 3,3 | 162 |
| Tryptophan | 3,28 | 3,21 | 3,25 | 159 |

Abbildung 1: graphische Darstellung der Kultivierung von CBS 7019 *M. furfur* mit Arginin

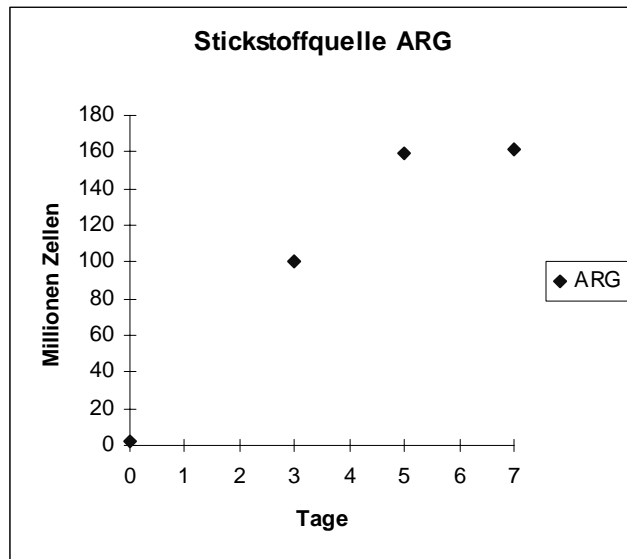
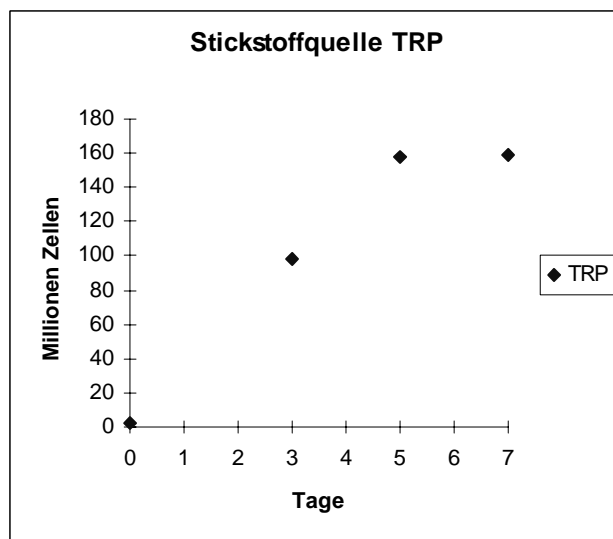


Abbildung 2: graphische Darstellung der Kultivierung von CBS 7019 *M. furfur* mit Tryptophan



Die Aminosäuren wurden gleich gut verstoffwechselt, und die Pilzkulturen waren von identischer Größe (siehe Abbildung 3).

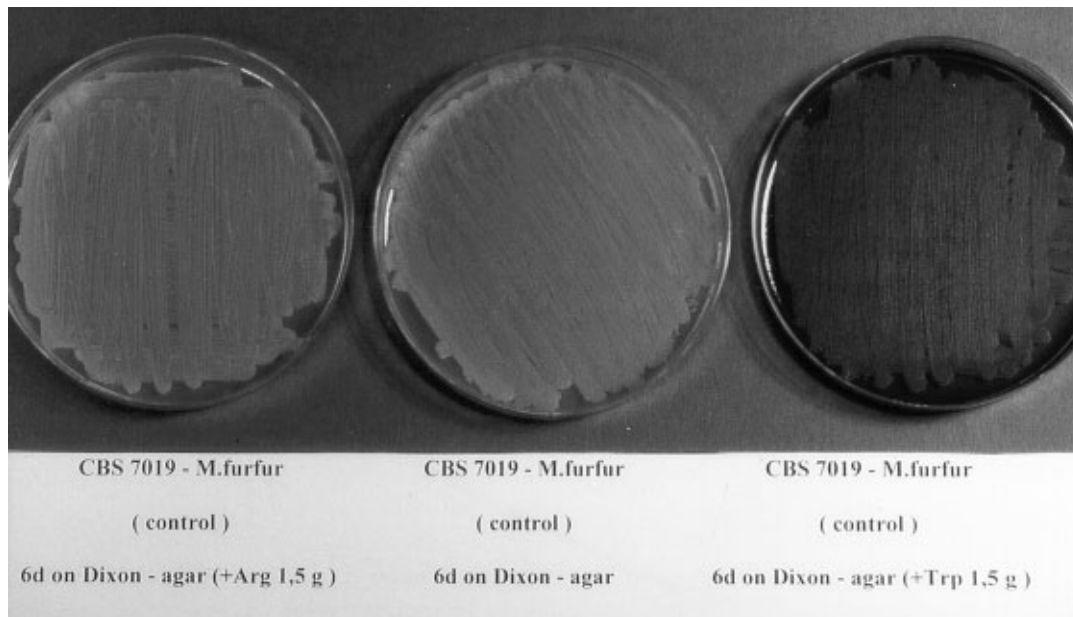


Abbildung 3 CBS 7019 auf Dixon-Agar mit ARG- bzw. TRP-Zusatz

Nach sechs Tagen war der Zeitpunkt zum Abernten (3.5.) der Zellen erreicht. Die Pilze waren noch nicht ausgetrocknet und hatten genügend Pigment gebildet. Für die anschließende Bestrahlung wurden die Hefen aller Stämme auf (m)Dixon-Agar mit Pepton aufgeimpft. Die Pilze wurden unmittelbar mit UVA bzw. UVB bestrahlt, weil der Pilzrasen nach 24 h zu stark gewachsen wäre.

Alle Pilzstämme wurden auf dieselbe Art bestrahlt (Abbildung 4). Bei mehrmaligen Bestrahlungen wurden die einzelnen Bestrahlungsdosen alle 24 h appliziert. Die Kontrollen wurden nicht bestrahlt. Unmittelbar nach der Bestrahlung wurden die Platten bei 32°C inkubiert.

Die UVA-Bestrahlung konnte nur einmalig erfolgen, weil der Nährboden aufgrund der hohen Temperaturen, die während der Bestrahlung im Bestrahlungsfeld entstanden, stark eintrocknete. Auf eine kühlende Unterlage wurde verzichtet.

Auf die Belüftung des Bestrahlungsfeldes mußte verzichtet werden, weil andernfalls die Möglichkeit bestanden hätte, daß die Nährmedien kontaminiert worden wären. Zur Minimierung des Kontaminationsrisikos wurde dem Nährmedium Chloramphenicol und Cycloheximid hinzugefügt.

Für das UVA- und UVB-Licht wurde im Anfangsstadium dieser Versuchsreihe eine Dosis-Effekt-Kurve erstellt (Tabelle 6 und Tabelle 7).

3.4. UVA- und UVB-Exposition

Die für die Versuche zur Verfügung stehenden technischen Geräte werden in der Lichtambulanz der Universitäts-Hautklinik in Gießen hauptsächlich für die Lichttherapie benutzt.

UV/PUVA 800: UV / Puva 800 (Waldmann, Schwenningen, Germany) ausgestattet mit Philips TL 20 W / 12-Lampen wurde als UVB-Quelle eingesetzt. Die UVB-Lampen haben ein Strahlungsspektrum von 285 nm bis 350 nm mit einem Maximum bei 310 nm bis 315 nm. Durch speziell angeordnete UV-Lampen und zusätzliche hochglanzpolierte Reflektoren wird eine gleichmäßige und intensive Bestrahlung erreicht. Die hohe Bestrahlungsintensität führte zu kurzen Bestrahlungszeiten.

Die Bestrahlungsstärke wurde täglich mit dem Waldmann-UV-Meter gemessen. Nach ca. 5 Minuten (bei kalten Strahlern) wurde die Strahlungsintensität in mW/cm^2 ermittelt.

$$\text{Bestrahlungszeit in sec} = \frac{\text{Gewünschte Dosis in J} / \text{cm}^2 \times 1000}{\text{Strahlungsleistung in mW} / \text{cm}^2}$$

Sellamed 4000: Die Bestrahlung mit UVA wurde mit einem Sellamed 4000 (Sellas Sunlight Gevelsberg, Germany) durchgeführt. Das Strahlungsspektrum lag zwischen 320-440 nm mit einem Maximum von 365 nm. Die Berechnung der Bestrahlungszeit erfolgte nach der oben angegebenen Formel. Die UV-Dosen wurden mit einem UV-Meter (Waldmann) gemessen.

Nach dem Vorglühen der Geräte wurde jedesmal mit einer Schablone, auf der 9 Felder eingezeichnet waren, die Intensität gemessen. Mit dem Mittelwert wurde dann die Bestrahlungszeit errechnet.

Die Position der Petrischalen wurden ohne Unterbrechung der Bestrahlung einmal untereinander gewechselt, so daß man die Differenzen, die zwischen den einzelnen Feldern bestanden, ausgleichen konnte.

Anzumerken ist noch, daß die Intensität während der Bestrahlung nicht meßbar abnahm. Nicht zu vernachlässigen ist die Temperaturzunahme und Erwärmung des Nährbodens während der Belichtung. Im Gegensatz zum UVB-Gerät, erhitze sich die Unterlage beim UVA - Gerät sehr deutlich. Bei einer Intensität von $60 \text{ mW} / \text{cm}^2$ betrug die Temperatur 36°C , wohingegen

sie bei $124 \text{ mW} / \text{cm}^2$ auf 42°C anstieg. Dies führte dann zur Eintrocknung des Agars. Mit UVA - Licht war daher nur eine einmalige Bestrahlung möglich.

UV - Meter: Mit dem UV-Meter (Waldmann Lichttechnik) wurden Bestrahlungsstärken der von den UV-Niederdrucklampen abgegebenen Strahlung in mW / cm^2 gemessen. Die Bestrahlungsstärke der Lampen war u. a. abhängig von Spannungsschwankungen im Stromnetz, von der Raumtemperatur und von den Betriebsstunden der Lampen. Das UV - Meter war ein notwendiges Zusatzgerät, um mit reproduzierbaren UV - Dosen arbeiten zu können. Um eine bestimmte Dosis in J / cm^2 zu erreichen, wurde die Bestrahlungsstärke in mW / cm^2 gemessen und die Belichtungszeit mit Hilfe der Umrechnungstabelle errechnet. Abhängig von der Strahlertype (UVA, UVB - Bereiche) erschien auf Knopfdruck sofort die digitale Anzeige der von den Strahlern emittierten Intensität (mW / cm^2). Der Doppelsensor befand sich an einer ausreichend langen, flexiblen Leitung, um ihn in der richtigen Meßentfernung zu den Lampen platzieren zu können.

Technische Daten: Die spektrale Empfindlichkeit des Doppelsensors entsprach exakt dem Spektrum der Original Waldmann-Niederdrucklampen (im Bereich UVA-Lampen bis $199,9 \text{ mW} / \text{cm}^2$ und im Bereich UVB-Lampen bis $19,99 \text{ mW} / \text{cm}^2$).

3.5. Methoden der Keimzahlbestimmung und Erstellung von Wachstumskurven

Für die quantitative Bestimmung von Wachstumszeiten wurde eine neue Zählmethode entwickelt. Bei dieser Methode war das Verklumpen der Pilzzellen, welches bei der bisherigen Zellzählung ein großes Problem war, irrelevant. Wie im folgenden beschrieben, wurde nur das Gewicht der Biomasse bestimmt.

Keimzahlbestimmung (direkte Methode)

Es wurde nur mit sterilen Materialien gearbeitet, um Verunreinigungen zu vermeiden. Mit einer ausgeglühten Platinöse wurden die Pilze vorsichtig vom Agar abgelöst, in einer Porzellanschale mit einem sterilisierten Mörser zerkleinert und mit ca. 1 ml NaCl $0,9 \%$ Lösung (Firma: Braun-Melsungen AG) vermischt. In einem sterilen Glasröhrchen (Firma: Assistent, Hannover, FRG) wurde dann die Pilzsuspension zur Waschung bei 1500 g drei Minuten lang zentrifugiert (Zentrifuge der Firma: Hettich, Typ: Rotanta / RP). Der NaCl -Überstand wurde abgesaugt und das Gefäß mit frischer physiologischer NaCl gefüllt. Auf

einem Reagenzglasschüttler (Firma: Vortex Genie 2TM) wurden die Sproßzellen gründlich mit NaCl vermischt.

Die Pilze wurden wie Erythrozyten in einer Neubauer Zählkammer (5 Gruppenquadrate) gezählt. Die Suspension mußte so lange mit NaCl verdünnt werden, bis eine Million Pilze in einem µl enthalten waren. Die Zellzahl wurde nach der Formel: $\text{Zellzahl} = S \times 50 \times f / \mu\text{l}$ berechnet.

S = Summe der ausgezählten Zellen in 5 Gruppenquadraten

f = Verdünnungsfaktor.

Verdünnt wurde maximal 100 fach bei hohen Zellkonzentrationen. Dies entspricht in etwa einer Konzentration von 6×10^6 Zellen / µl. Höher konzentrierte Suspensionen waren nicht mehr zählbar, da der Fehler zu groß wurde.

Die Zahl der Generationen n wurde folgendermaßen berechnet: $n = (\lg N - \lg N_0) / \lg 2$

N = Zellzahl nach Inkubation; N_0 = Ausgangszellzahl.

Die Generationszeit in Stunden (g) errechnete sich nach $g = t/n$.

t = Inkubationszeit in Stunden

Erstellung von Wachstumskurven (indirekte Methode zur Keimzahlbestimmung)

Die Wachstumskurven wurden indirekt durch Bestimmung des Trockengewichtes des Pilzes erstellt (Mayser und Pape 1998).

Die Anzucht der Hefezellen erfolgte auf (m)Dixon-Agar mit Arginin bzw. Tryptophan. Nach sechs Tagen wurde der Pilzthallus vorsichtig vom Agar abgelöst, in einem Mörser zerkleinert und mit physiologischer Kochsalzlösung (Braun, Melsungen) vermischt. Anschließend wurde die Suspension zweimal bei 1500g über 3 Minuten zentrifugiert und danach in einem Reagenzglasschüttler (Vortex Genie 2TM) mit frischem NaCl aufgeschüttelt. Die Pilzsuspension wurde auf 10^6 CFU/µl eingestellt (mittels Neubauerzählkammer). Jeweils zwei µl der Pilzlösung wurden mit einer Eppendorfpipette auf den Nährboden in jeweils mindestens drei Inokulatpunkten aufgetragen. Wegen der geringen Menge mußte die Pipettenspitze immer vorgespült werden. Bei der Bestrahlung sollten möglichst wenig Pilze übereinanderliegen, damit die oberen Zellschichten die unteren nicht vor der Bestrahlung schützten. Aus diesem Grund wurden jeweils nur zwei µl aufgetragen.

Es wurden alle Pilze, sowohl diejenigen, die einmalig oder mehrmalig mit UVA bzw. UVB exponiert wurden als auch die, welche nicht belichtet wurden, auf den jeweiligen

modifizierten Dixon-Agar aufgeimpft. So war gewährleistet, daß alle Pilze zum Zeitpunkt der Bestrahlung die gleichen Wachstumsbedingungen hatten.

Die erste Bestrahlung war sehr entscheidend. Zu diesem Zeitpunkt enthielten die einen Pilze das lichtschützende Pigment und die anderen nicht. Der Stoffwechsel der Pilze mußte sich nach dem Auftragen auf den Dixon-Agar auf Pepton umstellen. Die untersuchten *M.furfur* Stämme wurden nach dem gleichen Bestrahlungsschema belichtet. Die UVA- / und UVB-Dosen wurden in mehreren Vorversuchen festgelegt (Tabelle 6, Tabelle 7, Tabelle 8). Die Pilze wurden nur bis maximal 200 J/cm UVA bzw. 2000 mJ/cm UVB bestrahlt, da einige Pilzstämme wie 397, 1878 und 6094 den höheren UV-Belastungen nicht widerstehen konnten.

Tabelle 6: Bestrahlungszeit UVA , + bedeutet Wachstum zu verzeichnen, (+) bedeutet sehr wenig Wachstum sichtbar

| <i>M.furfur</i> Stamm | Amino- säure | keine Belich- tung | 50 J / cm ² UVA | 100 J / cm ² UVA | 150 J / cm ² UVA | 200 J / cm ² UVA | 250 J / cm ² UVA |
|--------------------------|-----------------|--------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 7019 | TRP | + | + | + | + | + | + |
| | ARG | + | + | + | + | + | + |
| 6046 | TRP | + | + | + | + | + | + |
| | ARG | + | + | + | + | + | (+) |
| 4162 | TRP | + | + | + | + | + | + |
| | ARG | + | + | + | + | + | (+) |
| 397 | TRP | + | + | + | + | kein Wachstum | kein Wachstum |
| | ARG | + | + | + | + | kein Wachstum | kein Wachstum |
| 1878 | TRP | + | + | + | + | + | + |
| | ARG | + | + | + | + | + | + |
| 6094 | TRP | + | + | + | + | + | + |
| | ARG | + | + | + | + | + | + |

Tabelle 7: Bestrahlungszeit UVB

| <i>M.furfur</i> Stamm | Amino- säure | keine Belich- tung | 100 mJ / cm ² UVB | 500 mJ / cm ² UVB | 1000 mJ / cm ² UVB | 1500 mJ / cm ² UVB | 2000 mJ / cm ² UVB | 2500 mJ / cm ² UVB |
|--------------------------|-----------------|--------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 7019 | TRP | + | + | + | + | + | + | + |
| | ARG | + | + | + | + | + | + | + |
| 6046 | TRP | + | + | + | + | + | + | + |
| | ARG | + | + | + | + | + | + | (+) |
| 4162 | TRP | + | + | + | + | + | + | + |
| | ARG | + | + | + | + | + | + | + |
| 397 | TRP | + | + | + | + | + | + | + |
| | ARG | + | + | + | + | + | kein Wachstum | kein Wachstum |
| 1878 | TRP | + | + | + | + | + | + | + |
| | ARG | + | + | + | + | + | kein Wachstum | kein Wachstum |
| 6094 | TRP | + | + | + | + | + | kein Wachstum | kein Wachstum |
| | ARG | + | + | + | + | + | kein Wachstum | kein Wachstum |

Tabelle 8: Bestrahlungszeit UVB kumulativ

| <i>M.furfur</i> Stamm | Amino- säure | keine Belich- tung | 500 mJ / cm ² UVB | 1500 mJ / cm ² UVB | 2500 mJ / cm ² UVB | 3000 mJ / cm ² UVB |
|--------------------------|-----------------|--------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 7019 | TRP | + | + | + | + | + |
| | ARG | + | + | + | + | + |
| 6046 | TRP | + | + | + | + | + |
| | ARG | + | + | + | kein Wachstum | kein Wachstum |
| 4162 | TRP | + | + | + | + | + |
| | ARG | + | + | + | + | kein Wachstum |
| 397 | TRP | + | + | + | + | + |

| | | | | | | |
|------|-----|---|---|---|---------------|---------------|
| | ARG | + | + | + | kein Wachstum | kein Wachstum |
| 1878 | TRP | + | + | + | + | + |
| | ARG | + | + | + | kein Wachstum | kein Wachstum |
| 6094 | TRP | + | + | + | + | (+) |
| | ARG | + | + | + | + | (+) |

Nach der entsprechenden Kultivierungszeit wurden die Pilzkulturen vorsichtig vom Agar abgehoben und in ein mit 1 ml NaCL gefülltes Glasröhrchen eingerührt. Es durfte kein Zellmaterial im Glas haften bleiben und kein Agar mit abgetragen werden, weil dadurch das Endergebnis verfälscht worden wäre. Das Ausgangsgewicht des trockenen Röhrchens war zuvor mit einer elektronischen Halbmikrowaage (Sartorius, Modell R 180 D, Ablesebereich 0,01-0,1 mg, Göttingen) bestimmt worden. Anschließend wurde das Röhrchen bei 2750 g fünf Minuten lang zentrifugiert (Hettich Rotando HP). Die überstehende Flüssigkeit wurde vollständig abgesaugt. Jedoch durfte kein Zellmaterial mit aufgesaugt werden.

Das Zellmaterial in den Glasröhrchen wurde in einem Techne DRI-Block DB3 (Thermo Dux, Heidelberg) über 24h bei 65 °C getrocknet.

Tabelle 9: Unterschiedliche Trockentemperaturen

| Zellzahl in Mio. | 50°C /24 h | 65°C / 24 h | 80°C / 24 h |
|------------------|---------------------------|--------------|-------------|
| 300 | nicht trocken | 6,21; 6,30 | 6,25; 6,20 |
| 200 | nicht trocken | 4,15; 4,22 | 4,19; 4,25 |
| 150 | nicht trocken | 3,10; 3,15 | 3,09; 3,15 |
| 125 | 2,59; 2,60 halbtrocken | 2,55; 2,44 | 2,50; 2,42 |
| 100 | 2,15; 2,09 | 2,08; 2,02 | 2,11; 2,09 |
| 75 | 1,50; 1,57 | 1,54; 1,49 | 1,59; 1,51 |
| 50 | 0,99; 1,08 | 0,95; 1,02 | verkohlt |
| 25 | 0,43; 0,42 | 0,43; 0,42 | verkohlt |
| 0 | 0,07; 0,06 | 0,071; 0,069 | verkohlt |

Bei 50 °C trockneten selbst kleine Pilzmengen nicht vollständig durch. Bei höheren Temperaturen (80 °C) waren die kleinen Pilzmengen bereits verkohlt. 65 °C erwies sich als die ideale Temperatur (Tabelle 9).

Die Pilze wurden immer am fünften Tag abgeerntet. Dieser Zeitpunkt erwies sich (Tabelle 10) als am geeignetsten, weil die Pilzkolonien zu diesem Zeitpunkt ihren Wachstumshöhepunkt erreicht hatten und gut aberntbar waren.

Tabelle 10: Kulturdauer

| Belichtung | 3 Tage | 3Tage | 5 Tage | 5 Tage | 7 Tage | 7 Tage |
|--|---|---|---------------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|
| | ARG | TRP | ARG | TRP | ARG | TRP |
| keine | 2,08; 1,99 | 2,05; 1,98 | 3,08; 3,19; 3,14; 3,28 | 3,11; 3,21; 3,27; 3,35 | 3,26; 3,35 Risse | 3,28; 3,21 Risse |
| 100J/cm ² UVA | 1,63; 1,58 | 1,65; 1,62 | 2,78; 2,91; 2,95; 2,83 | 2,95; 2,83; 2,98; 2,87 | 2,95; 2,87 Risse | 2,99; 2,90 Risse |
| 200J/cm ² UVA | 0,51; 0,58 zu weich | 1,22; 1,29 | 1,25; 1,17; 1,15; 1,28 | 1,85; 1,97; 1,88; 1,93 | 1,32; 1,25 | 2,09; 1,98 Risse |
| 1000 mJ/cm ² UVB | 0,82; 0,88 | 1,53; 1,48 | 1,66; 1,73; 1,61; 1,70 | 2,62; 2,66; 2,59; 2,68 | 1,63; 1,55 | 2,59; 2,44 Risse |
| 1000 mJ/cm ² UVB | 0,19; 0,05 zu weich, Material- verlust | 1,12; 1,21 | 0,68; 0,58; 0,71; 0,63 | 1,96; 2,05; 1,91; 2,02 | 0,71; 0,65 | 1,96; 1,92 |
| 1500 mJ/cm ² UVB kumulativ | 0,75; 0,61 zu weich, Material- verlust | 1,12; 1,24 | 1,33; 1,38; 1,42; 1,29 | 1,98; 2,05; 1,97; 1,99 | 1,43; 1,38 | 2,05; 1,91 Risse |
| 2500 mJ/cm ² UVB kumulativ | 0,39; 0,12 zu weich, Material- verlust | 0,89; 0,72 zu weich, Material- verlust | 0,79; 0,89; 0,95; 0,83 | 1,77; 1,83; 1,88; 1,91 | 0,89; 0,81 | 1,83; 1,89 |

Zu einem früheren Zeitpunkt wären die Pilze noch zu klein und in ihrer Konsistenz noch zu weich gewesen zum Abtragen. Es wäre zum Materialverlust gekommen. Bei noch längerer Bebrütungsdauer hätten die Pilze begonnen auszutrocknen. Die Pilzkultur würde dann Risse zeigen und schrumpfen.

Es wurde immer nur eine Pilzkultur abgeerntet. Dadurch war gewährleistet, dass die Zellmenge auch gut durchtrocknete (Tabelle 11).

Tabelle 11: Anzahl der abgeernteten Inokulatpunkte

| Belichtung | Aminosäure | 1 Inokulatpunkt | 2 Inokulatpunkte |
|--|------------|------------------------|------------------|
| keine | TRP | 3,11; 3,21; 3,27; 3,35 | sehr feucht |
| keine | ARG | 3,08; 3,19; 3,14; 3,28 | sehr feucht |
| 100 J/cm ² UVA | TRP | 2,95; 2,83; 2,98; 2,87 | sehr feucht |
| 100 J/cm ² UVA | ARG | 2,78; 2,91; 2,95; 2,83 | sehr feucht |
| 200 J/cm ² UVA | TRP | 1,85; 1,97; 1,88; 1,93 | etwas feucht |
| 200 J/cm ² UVA | ARG | 1,25; 1,17; 1,15; 1,28 | 2,40; 2,45 |
| 1000 mJ/cm ² UVB | TRP | 2,62; 2,66; 2,59; 2,68 | feucht |
| 1000 mJ/cm ² UVB | ARG | 1,66; 1,73; 1,61; 1,70 | 3,35; 3,30 |
| 2000 mJ/cm ² UVB | TRP | 1,96; 2,05; 1,91; 2,02 | feucht |
| 2000 mJ/cm ² UVB | ARG | 0,68; 0,58; 0,71; 0,63 | 1,20; 1,25 |
| 1500 mJ/cm ² UVB kumulativ | TRP | 1,98; 2,05; 1,97; 1,99 | etwas feucht |
| 1500 mJ/cm ² UVB kumulativ | ARG | 1,33; 1,38; 1,42; 1,29 | 2,71 |
| 2500 mJ/cm ² UVB kumulativ | TRP | 1,77; 1,83; 1,88; 1,91 | etwas feucht |
| 2500 mJ/cm ² UVB kumulativ | ARG | 0,79; 0,89; 0,95; 0,83 | 1,75; 1,78 |

Nach Abkühlung der Glasröhrchen (Abbildung 5) auf Zimmertemperatur wurden sie gewogen. Als Kontrolle wurden bei jeder Versuchsreihe vier Gläser mit 50 µl NaCl 0,9 % mitgetrocknet.

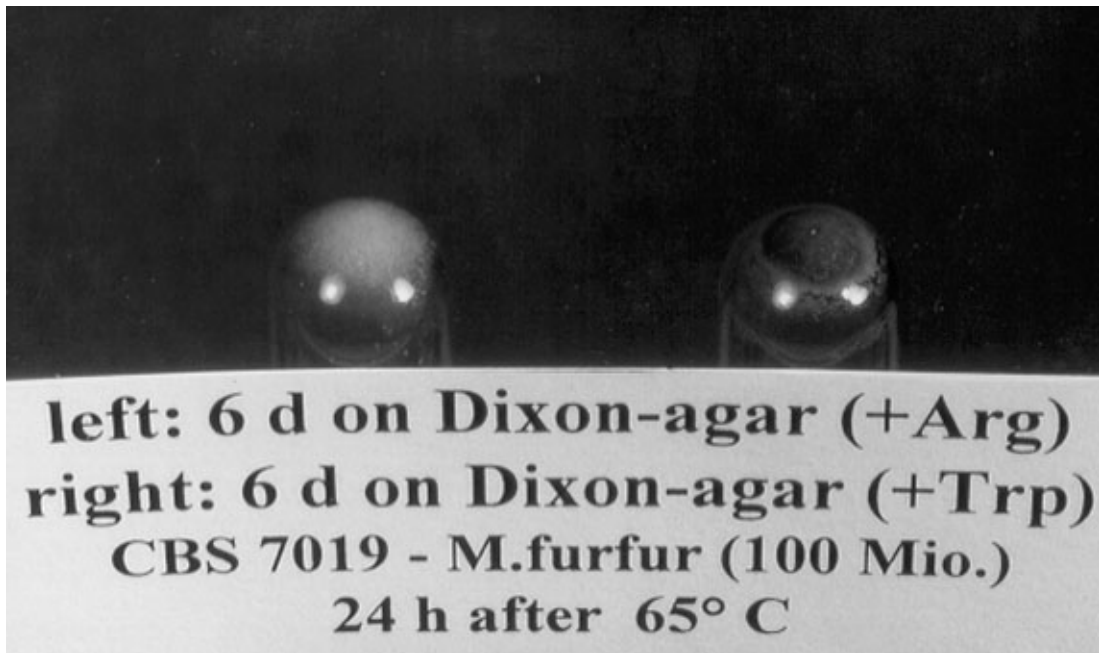


Abbildung 5: CBS 7019 -*M. furfur* nach einer 24 -Std. Trocknung

Die Differenz zwischen Endgewicht und Ausgangsgewicht der Glasröhrchen entspricht dem Gewicht der abgeernteten Pilze.

Es wurde mittels einer jeweiligen Standardeichkurve, die durch direkte Zellzählung erstellt wurde, in die absolute Zellzahl umgerechnet. Bei jedem Versuch wurden mehrere bekannte Zellmengen mitgeführt und der Versuch damit jeweils noch einmal intern geeicht. Für jeden Teststamm wurde auf jedem Testmedium eine eigene Eichkurve erstellt.

Erstellung von Eichkurven

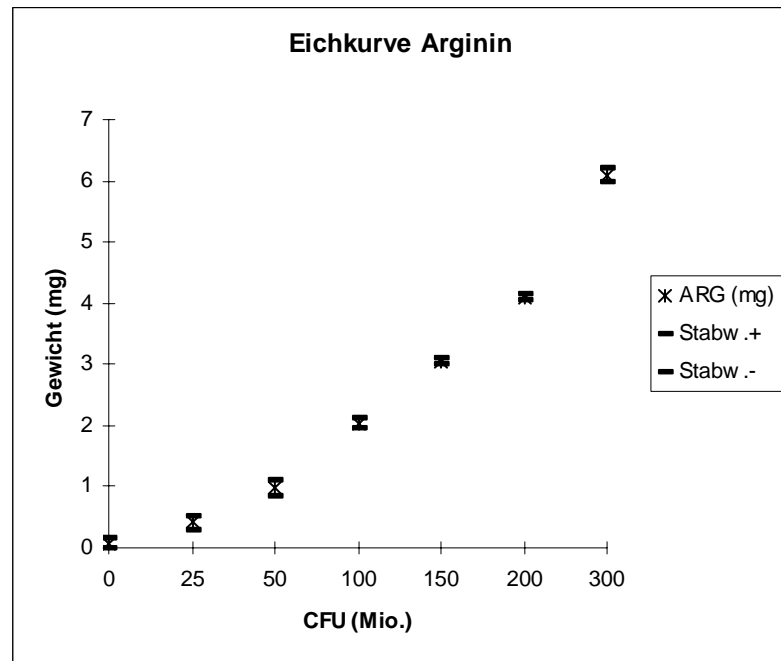
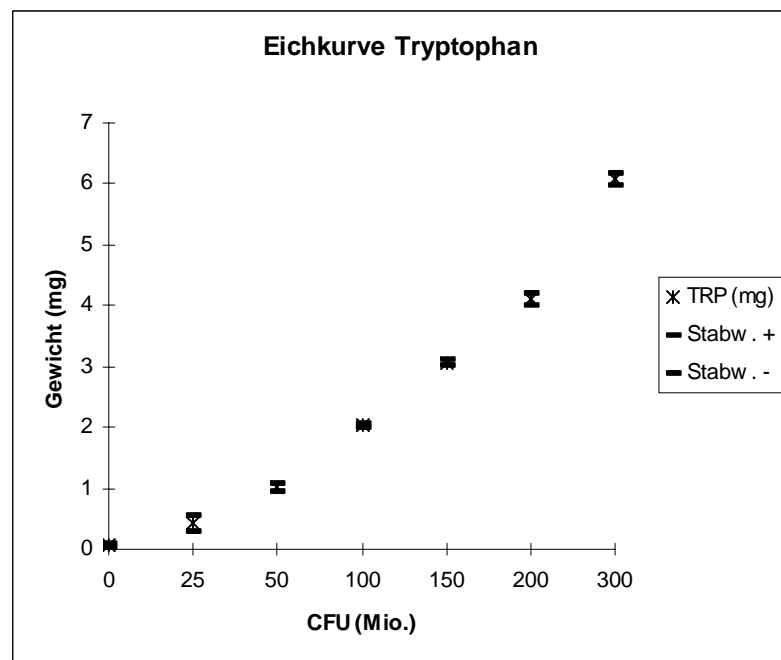
Aus einer auf 10^6 CFU / μ l eingestellten Pilzsuspension wurden bekannte Zellmengen abgenommen und in Reagenzgläschen abgefüllt, deren Leergewicht zuvor bestimmt worden war. Die Gläschen wurden fünf Minuten lang bei 2750 g zentrifugiert und im Heizblock über 24 h bei 65°C getrocknet. Die Differenz zwischen Endgewicht und Leergewicht ermöglicht die Gewichtsbestimmung der eingewogenen Zellzahlen. Die Werte wurden in ein Diagramm eingetragen, wobei die x-Achse die Zellzahlen angab, und auf der y-Achse die entsprechenden Gewichte abgetragen wurden. Es wurden für jeden Stamm und für jede Zellzahl zumindest drei unabhängige Versuche durchgeführt. Jeder Versuch wurde intern durch Mitführen bekannter Zellzahlen geeicht.

Die nachfolgende Tabelle 12 und die Abbildung 6 und Abbildung 7 zeigen die Eichkurven, die sich aus untersuchten *Malassezia*-Stämmen ergaben.

Tabelle 12: Eichkurven-Meßergebnisse aus 7019, 1878, 6046, 4162, 397 und 6094

| Pilz | Zellzahl (Mio.) | ARGm g | TRP mg | Zellzahl (Mio.) | ARGm g | TRP mg | Zellzahl (Mio.) | ARGm g | TRP mg |
|------|--------------------|-----------|-----------|--------------------|-----------|-----------|--------------------|-----------|-----------|
| 7019 | 0 | 0,02 | 0,04 | 25 | 0,18 | 0,25 | 50 | 0,92 | 1,11 |
| | | 0,06 | 0,07 | | 0,2 | 0,3 | | 0,99 | 1,1 |
| | | 0,08 | 0,09 | | 0,28 | 0,2 | | 1,05 | 1,12 |
| | | 0,04 | 0,02 | | 0,32 | 0,22 | | 1,03 | 0,99 |
| 1878 | 0 | 0,05 | 0,07 | 25 | 0,4 | 0,47 | 50 | 1,01 | 1,03 |
| | | 0,02 | 0,09 | | 0,49 | 0,5 | | 0,98 | 0,96 |
| | | 0,09 | 0,12 | | | | | | |
| | | 0,13 | 0,05 | | | | | | |
| 6046 | 0 | 0,02 | 0,03 | 25 | 0,45 | 0,48 | 50 | 0,96 | 1,02 |
| | | 0,018 | 0,027 | | 0,55 | 0,56 | | 0,99 | 0,95 |
| | | 0,022 | 0,033 | | | | | | |
| | | 0,027 | 0,03 | | | | | | |
| 4162 | 0 | 0,12 | 0,02 | 25 | 0,41 | 0,38 | 50 | 1,01 | 0,91 |
| | | 0,08 | 0,09 | | 0,49 | 0,42 | | 0,98 | 0,95 |
| | | 0,04 | 0,1 | | 0,52 | 0,49 | | 1,05 | 1,05 |
| | | 0,01 | 0,15 | | 0,42 | 0,5 | | 1,08 | 1,01 |
| 397 | 0 | 0,03 | 0,05 | 25 | 0,51 | 0,53 | 50 | 1,03 | 1,05 |
| | | 0,07 | 0,06 | | 0,49 | 0,55 | | 0,99 | 1,02 |
| | | 0,1 | 0,02 | | | | | | |
| | | 0,01 | 0,1 | | | | | | |
| 6094 | 0 | 0,12 | 0,02 | 25 | 0,47 | 0,54 | 50 | 1,03 | 1,04 |
| | | 0,13 | 0,06 | | 0,52 | 0,48 | | 0,51 | 1,02 |
| | | 0,04 | 0,08 | | | | | | |
| | | 0,5 | 0,13 | | | | | | |
| MW | 0 | 0,076 | 0,065 | 25 | 0,419 | 0,429 | 50 | 0,976 | 1,021 |
| S | | 0,099 | 0,038 | | 0,115 | 0,122 | | 0,130 | 0,059 |
| S + | | 0,175 | 0,103 | | 0,534 | 0,551 | | 1,106 | 1,080 |
| S - | | -0,02 | 0,027 | | 0,304 | 0,308 | | 0,845 | 0,961 |
| 7019 | 100 | 2,12 | 1,99 | 150 | 3,11 | 3,15 | 200 | 4,1 | 4,2 |
| | | 2 | 2,05 | | 3,03 | 3,08 | | 4,08 | 3,99 |
| | | 2,19 | 2,08 | | 3,15 | 3,11 | | 4,15 | 4,18 |

| | | | | | | | | | |
|------|-----|-------|-------|-----|-------|-------|-----|-------|-------|
| | | 2,18 | 2,1 | | 3,08 | 3,09 | | 4,03 | 4,22 |
| 1878 | 100 | 2,02 | 2,01 | 150 | 3,08 | 2,97 | 200 | 4,13 | 4,05 |
| | | 1,97 | 2,05 | | 3,02 | 2,99 | | 4,08 | 4,11 |
| 6046 | 100 | 1,96 | 2,08 | 150 | 3,08 | 3,1 | 200 | 4,1 | 4,02 |
| | | 2,06 | 2,02 | | 2,99 | 3,05 | | 4,12 | 4,11 |
| 4162 | 100 | 1,99 | 2,02 | 150 | 3,07 | 3,1 | 200 | 4,05 | 4,03 |
| | | 2,06 | 2,13 | | 2,97 | 3,05 | | 4,15 | 4,15 |
| | | 2,1 | 2,08 | | 3,1 | 3,15 | | 4,2 | 4,08 |
| | | 2,03 | 2,01 | | 3,01 | 3,02 | | 4,15 | 4,1 |
| 397 | 100 | 1,97 | 2,05 | 150 | 3,02 | 3,05 | 200 | 4,05 | 4,03 |
| | | 1,95 | 2,02 | | 2,98 | 3,02 | | 4 | 3,99 |
| 6094 | 100 | 2,03 | 2,01 | 150 | 3,09 | 3,04 | 200 | 4,12 | 4,07 |
| | | 1,98 | 2,05 | | 3,07 | 3,06 | | 4,15 | 4,3 |
| MW | 100 | 2,038 | 2,047 | 150 | 3,053 | 3,064 | 200 | 4,104 | 4,102 |
| S | | 0,075 | 0,039 | | 0,052 | 0,052 | | 0,053 | 0,089 |
| S + | | 2,114 | 2,086 | | 3,105 | 3,116 | | 4,157 | 4,190 |
| S - | | 1,963 | 2,008 | | 3,002 | 3,013 | | 4,051 | 4,013 |
| 7019 | 300 | 6,22 | 6,3 | | | | | | |
| | | 6,19 | 6,25 | | | | | | |
| | | 6,29 | 6,2 | | | | | | |
| | | 6,33 | 6,18 | | | | | | |
| 1878 | 300 | 6,04 | 6,05 | | | | | | |
| | | 5,97 | 5,94 | | | | | | |
| 6046 | 300 | 5,99 | 5,91 | | | | | | |
| | | 6,03 | 6,01 | | | | | | |
| 4162 | 300 | 6,09 | 6,02 | | | | | | |
| | | 6,15 | 6,09 | | | | | | |
| | | 5,99 | 6,12 | | | | | | |
| | | 6,1 | 6,15 | | | | | | |
| 397 | 300 | 5,99 | 6,03 | | | | | | |
| | | 6,02 | 6,05 | | | | | | |
| 6094 | 300 | 5,97 | 5,99 | | | | | | |
| | | 6,02 | 6,05 | | | | | | |
| MW | | 6,087 | 6,084 | | | | | | |
| S | | 0,116 | 0,109 | | | | | | |
| S + | | 6,203 | 6,193 | | | | | | |
| S - | | 5,971 | 5,975 | | | | | | |

Abbildung 6: Eichkurve mit Arginin (7019, 1878, 6046, 4162, 397, und 6094)**Abbildung 7: Eichkurve mit Tryptophan (7019, 1878, 6046, 4162, 397, und 6094)**

3.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Größenunterschiede der Biomasse zwischen ARG und TRP gefütterten Zellen bei unterschiedlicher UV-Exposition wurde mit einem parametrischen Test (students t test für unverbundene Stichproben) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf einen zweiseitigen p-Wert $<0,05$ gesetzt.

3.7. UV-Filter auch für Menschen nutzbar?

Die Hefezellen scheinen mit Tryptophan einen UV-Filter aufgebaut zu haben. Vor diesem Hintergrund wurde versucht, das Tryptophan induzierte Pigment zu gewinnen und so für den Menschen nutzbar zu machen. An mehreren freiwilligen Probanden wurde dieses Experiment vorgenommen.

Bei den Probanden wurde mittels einer UVB-Lichttreppe die MED, also die minimale Erythemdosis bestimmt. Dies entspricht der Bestrahlungsdosis, bei der eine leichte bis mittelgradige Rotfärbung der nicht vorgebräunten Haut nach 24 h entsteht.

MED:

Für die Ermittlung eines objektiven Wertes der Lichtempfindlichkeit der Haut gegenüber erythmerzeugender UVB-Strahlung dient die Bestimmung der "minimalen Erythemdosis" (MED). Die MED im UVB-Bereich liegt bei etwa $0,038-0,053 \text{ J/cm}^2$, im UVC-Bereich bei $0,02 \text{ J/cm}^2$ und im UVA-Bereich etwa 1000 mal mehr ($20-50 \text{ J/cm}^2$) (Braun-Falco 1997,Kap.70).

Auf dem Rücken der Versuchspersonen wurden mit einer lichtundurchlässigen Schaumstoffschablone 8 kleine Felder ($1,5 \times 1,5 \text{ cm}$) aufgemalt. Die Schablone wurde dort während der Bestrahlung belassen und sorgte dafür, daß nur die 8 Felder bestrahlt wurden. Die übrige Haut wurde gut mit Stofftüchern geschützt. Die einzelnen Felder wurden einzeln nacheinander mit 12,5/ 25/ 37,5/50/ 62,5/ 75/ 100/ oder 125 mJ / cm^2 UVB bestrahlt. Nach 24 h wurde am Rücken die minimale Erythemdosis abgelesen.

In einem noch nicht bestrahlten Hautanteil des Unterarmes zeichnete man erneut mit der Schablone 2 Quadrate auf. Ein Quadrat wurde mit einem Wattestäbchen mit dem aus dem Pilz gewonnenen Extrakt bepinselt, bis sich die Haut leicht braun färbte. Das Testareal fluoreszierte im UV-Licht. Das andere Viereck blieb unbehandelt. Anschließend wurden diese

Quadrate mit der Bestrahlungsdosis, die der MED jedes einzelnen Probanden entsprach, bestrahlt.

Nachfolgend wurde dergleiche Versuch am Rücken wiederholt. Nun wurde noch ein zusätzliches Viereck aufgemalt. Dort wurde der Extrakt in derselben Konzentration aufgetragen und nach fünfminütiger Eintrocknungszeit mit Wasser abgewaschen. Anschließend wurde mit derselben Bestrahlungsdosis bestrahlt wie in dem vorherigen Versuch. Für die Bestrahlung wurden dieselben Geräte verwendet wie für die Pilzversuche. Unter dem Punkt 4.3. "Ergebnis des Lichtversuchs am Menschen" sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen detailliert dargestellt.

3.7.1. Gewinnung von Rohextrakt und Pigment aus *M. furfur* und Nährmedium

Zur Gewinnung des Rohextraktes wurde der Referenzstamm des *M. furfur* (CBS 7019) mit einem Tupfer auf Dixon-Agar aufgetragen und 14 Tage lang inkubiert (Mayser und Wille 1998). Anschließend wurde der Inhalt der Petrischalen püriert und über 12 h mit Ethylacetat (EE, Merck) extrahiert. Danach wurde der Rohextrakt über Glaswolle gefiltert, und das Lösungsmittel in einem Rotationsverdampfer abgedampft. Der Rückstand wurde mit Ethanol aufgenommen und auf pH 5,0 eingestellt.

Anschließend wurde das Absorptionsspektrum des Extraktes bei 578 nm mit einem Beckman DU - 68 Spektralphotometer gemessen. Der Nullpunkt wurde mit Methanol 96 % eingestellt.

4. Ergebnisse

4.1. Medium ohne UV-Bestrahlung

Rein makroskopisch sind die Pilze mit dem Zusatz der Aminosäure TRP dunkelbraun pigmentiert, wohingegen die mit ARG angezüchteten Hefen von cremegelber Farbe sind, also keine Pigmentierung aufweisen. Nur CBS 6094 wächst sowohl mit TRP-Zusatz als auch mit ARG ohne Pigmentbildung.

Unter dem Lichtmikroskop ist kein Unterschied zwischen mit UV-belichteten und unbelichteten Pilzstämmen erkennbar. Auf TRP-haltigem Medium bildeten sich vermehrt große runde Zellen aus, während die mit ARG angezüchteten eher oval und kleiner waren (Mayser und Imkamp 1998).

4.2. Medium mit UVA-Bestrahlung (einmalig)

Eine UV-Exposition hatte bei allen untersuchten Pilzgattungen eine Einschränkung der Wachstumsrate zur Folge (Abbildung 8).

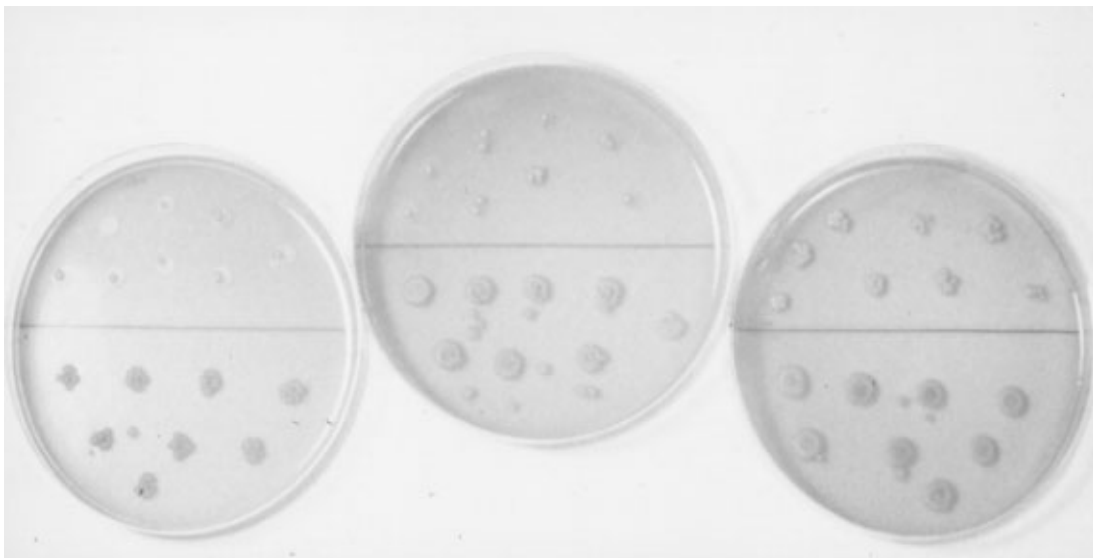


Abbildung 8: CBS 7019 nach UV-Bestrahlung (oben TRP- unten ARG-Zusatz)

Die belichteten Pilze waren von cremegelber Farbe und ließen sich aufgrund ihrer langsam härter werdenden Konsistenz gut abernten. Dabei war das Wachstum der Kolonien, die auf ARG-haltigen Nährmedien angezüchtet worden sind, bis auf CBS 6094, bei allen Pilzspezies

stärker abgesunken als auf TRP-haltigem Medium. Auf den jeweiligen unbelichteten Kontrollplatten war das Wachstum identisch.

Im Anhang sind die einzelnen Meßergebnisse in tabellarischer Aufstellung aufgeführt. Die sich hier anschließenden Graphiken stellen die Pilzzahl (in Millionen) nach fünf Tagen Wachstumszeit in Abhängigkeit von der jeweiligen UVA-Bestrahlungsintensität dar. Die Pilze wurden einmalig mit einer vorgeschriebenen UVA-Dosis (100, 150, 200 J cm⁻²) bestrahlt.

UVA-Bestrahlungsschema:

0, 100, 150, 200 J cm⁻² UVA

Die Meßergebnisse werden in einer x/y-Graphik dargestellt. Auf der x-Achse sind die Bestrahlungsintensitäten in J cm⁻² eingetragen. Auf der dazu senkrecht stehenden y-Achse sind die bei der entsprechenden Bestrahlung gewachsenen Pilze in Millionen eingetragen.

Die eingetragenen Werte sind als Mittelwerte zu verstehen (je Stamm vier unabhängige Werte). Zusätzlich wurden die Standardabweichungen eingetragen. Bei stärkeren Bestrahlungsintensitäten wuchsen die Pilze teilweise nur noch in Einzelkolonien. Wie im Anhang nachzulesen, sind einige der aufgeimpften Pilze gar nicht gewachsen. Bei den Berechnungen wurden die Nullwerte mit in die Rechnung einbezogen. Aus diesem Grund sind die Standardabweichungen bei einigen Untersuchungen höher als bei anderen.

Die untersuchten pigmentproduzierenden *M. furfur*-stämmen zeigten eine unterschiedlich stark ausgeprägte UV-Resistenz. Gerade in dem hohen UVA-Bereich waren die Wachstumsunterschiede bei den verglichenen Gruppen signifikant ($p < 0,0001$). Die von den Pilzen gebildeten TRP-Derivate sorgen insbesondere bei den hohen UV-Intensitäten für den Lichtschutz.

Abbildung 9: Graphische Darstellung CBS 7019 - UVA

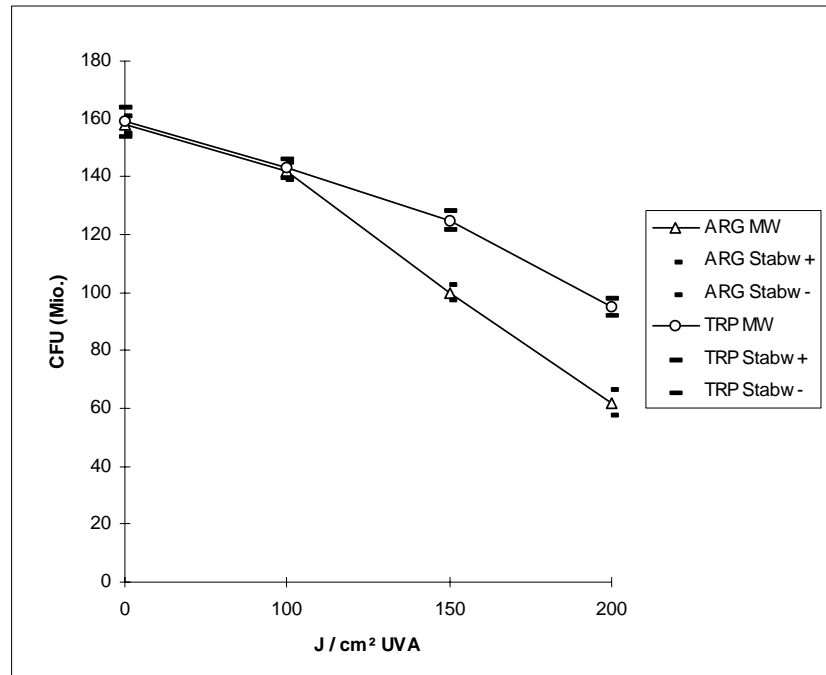
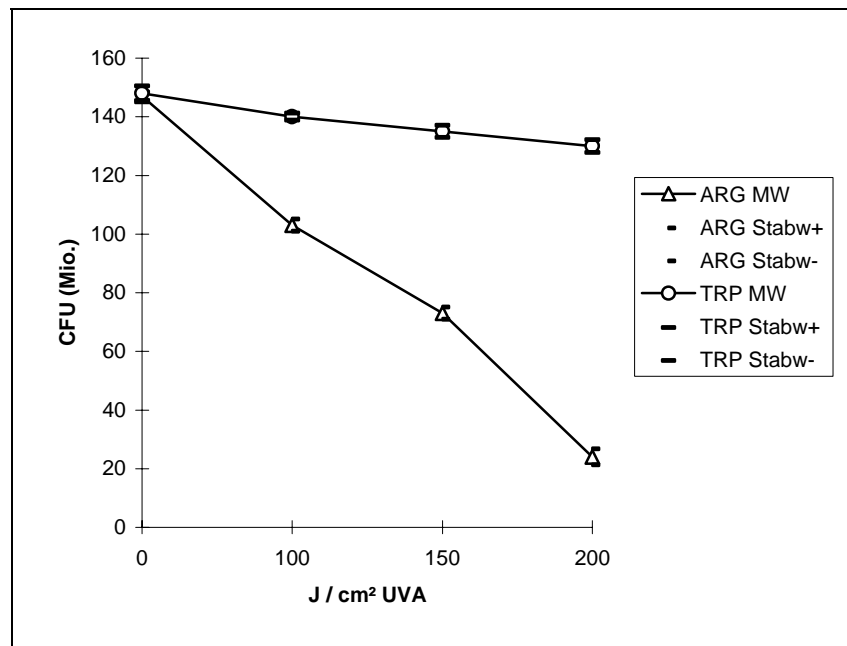


Abbildung 10: Graphische Darstellung CBS 6046 – UVA



Die Abbildung 9 zeigt, daß bei einer einmaligen Bestrahlung mit 200 J cm^{-2} UVA die mit ARG angezüchteten Pilze von 158 Mio. auf 62 Mio. gesunken sind, wohingegen die mit TRP-Zusatz nur auf 95 Mio. abgesunken sind. Das ist eine Differenz von 33 Mio. Pilzzellen. Der Wachstumsunterschied ist hochsignifikant ($p < 0,0001$).

Mit ansteigender applizierter UVA-Dosis nimmt das Wachstum bei beiden Gruppen ab, aber die Wachstumsreduktion der mit ARG angezüchteten Hefen ist größer

(Abbildung 10). Bei einer UVA-Applikation von 200 J cm^{-2} zeigt die eine Gruppe (ARG) eine Reduktion auf 16% (d.h. 24 Mio) und die andere Gruppe auf 88% (d.h. 130 Mio.). Der Unterschied ist hochsignifikant ($p < 0,0001$).

Abbildung 11: Graphische Darstellung CBS 4162 - UVA

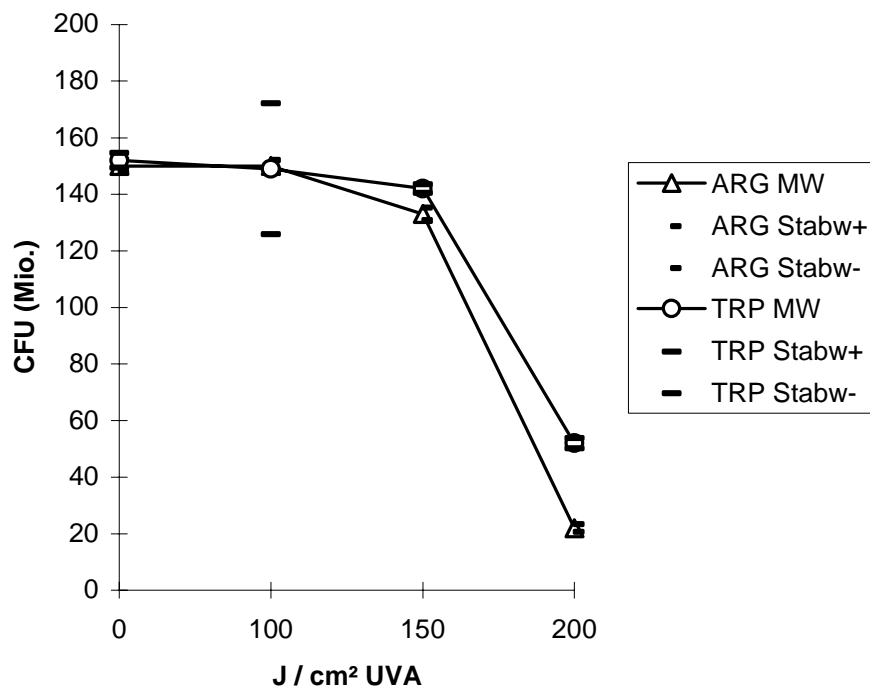
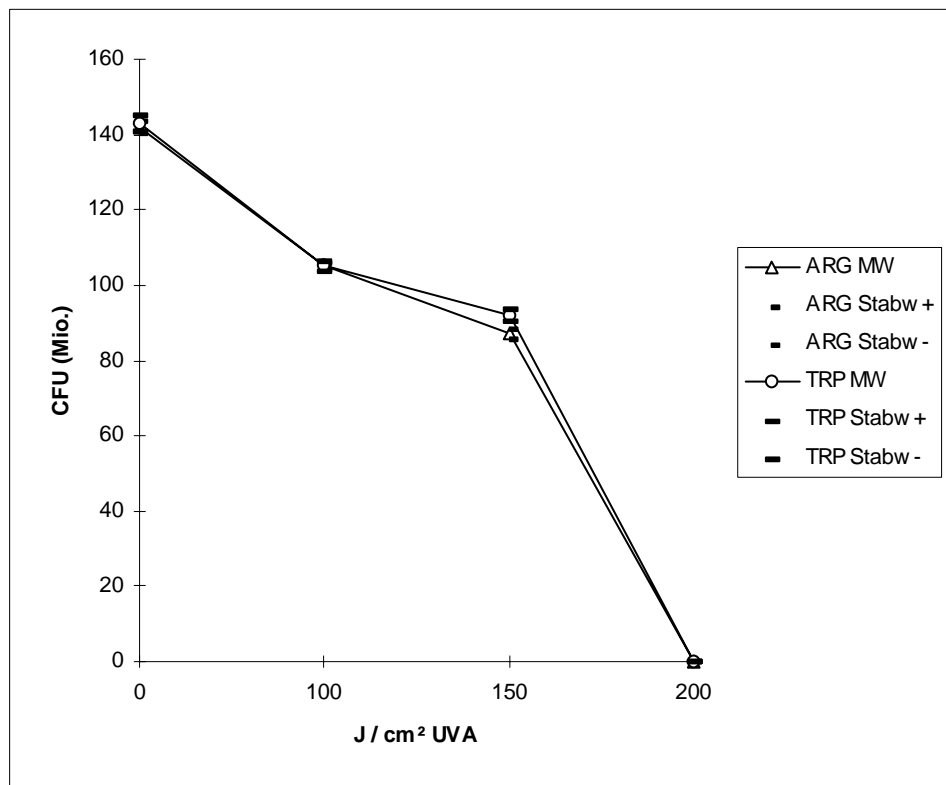
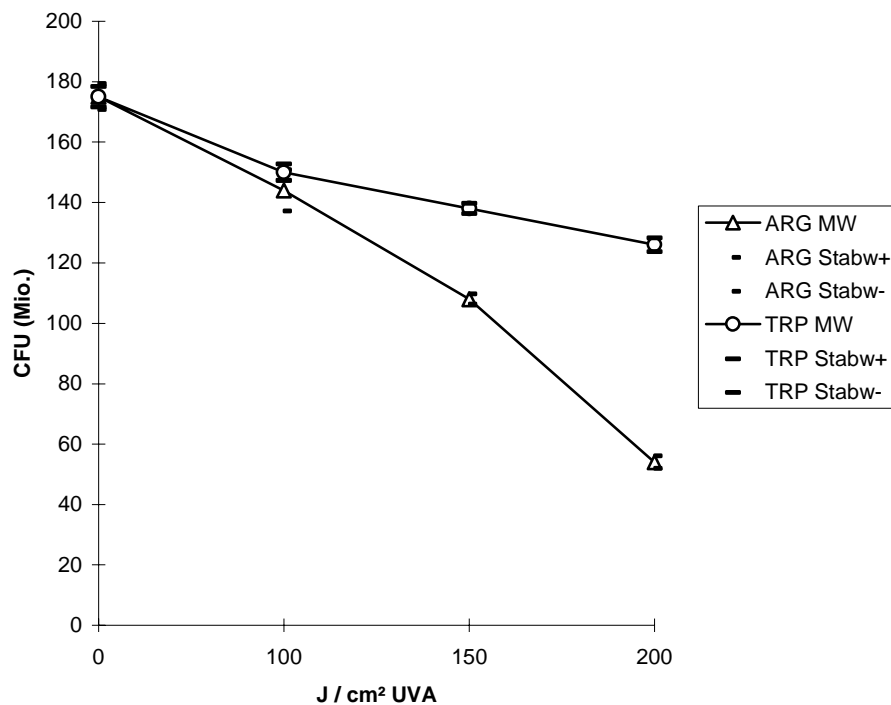


Abbildung 11 zeigt, daß erst eine Bestrahlungsdosis von 200 J cm^{-2} zu einem signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p < 0,0001$) führt. Die mit ARG angezüchteten Hefen verringern sich auf 22 Mio. und die entsprechend mit TRP angezüchteten auf 52 Mio.

Abbildung 12: Graphische Darstellung Wildstamm 397 - UVA

Der Wildstamm 397 zeigt in den Untersuchungen die höchste UV-Sensitivität unter allen verglichenen Pilzen. In Abbildung 12 ist sichtbar, daß beide Vergleichsgruppen auf die entsprechende UVA-Applikation mit beinahe derselben Wachstumsreduktion reagieren. Nach einer UVA-Applikation von 100 J cm^{-2} sinkt die Zellzahl auf 105 Mio. ab unabhängig von der Stickstoffquelle. Im Vergleich zu den unbelichteten Kontrollen entspricht dies einer Reduktion um 25%. Bei 200 J cm^{-2} UVA zeigen beide Gruppen kein Wachstum mehr. Im Vergleich zu den anderen untersuchten Stämmen ist der Wildstamm 397 der einzige, der unabhängig von der verwendeten Stickstoffquelle bei 200 J cm^{-2} UVA gar kein Wachstum mehr zeigt. Er ist in diesem Bereich sehr UV-sensitiv.

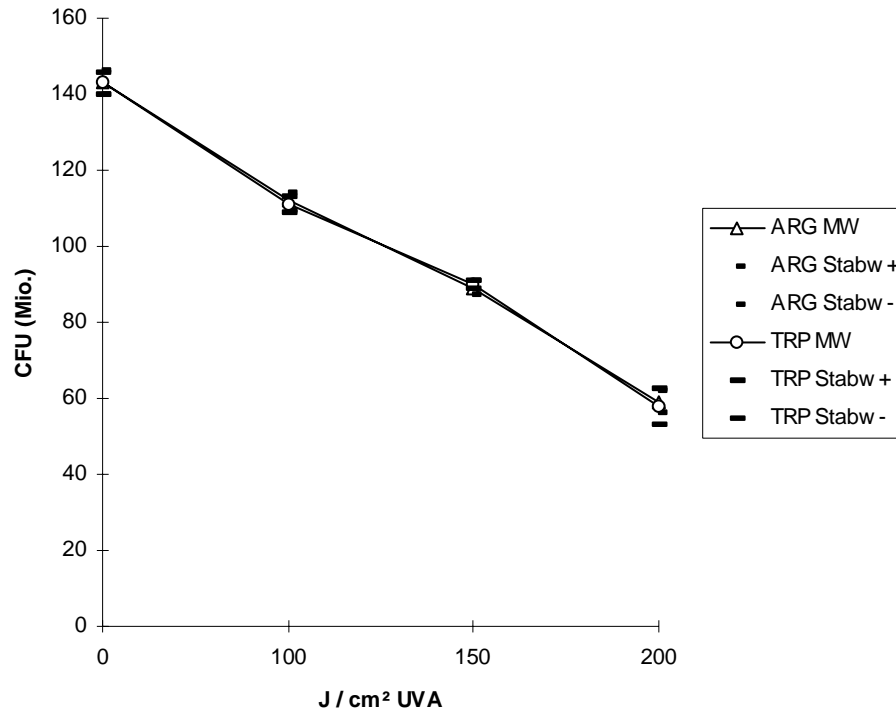
Abbildung 13: Graphische Darstellung CBS 1878 - UVA

Erst ab einer Bestrahlung mit 150 J cm^{-2} UVA ist der Unterschied zwischen beiden Gruppen (Abbildung 13) signifikant ($p < 0,0001$) und bleibt auch signifikant bei weiterer Dosiserhöhung auf 200 J cm^{-2} . Die unbelichteten Kontrollen des CBS 1878 zeigen mit 175 Mio. (sowohl ARG als auch TRP) Zellen das stärkste Wachstum unter den verglichenen unbelichteten Kontrollen aller untersuchten Pilz-Stämme. Mit zunehmender Bestrahlungsstärke (200 J cm^{-2} UVA) nimmt die Differenz weiter zu (41%).

Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Pilzstämmen bildet CBS 6094 bei TRP-Zusatz keine braunen Pigmente. Rein makroskopisch kann man die mit TRP angezüchteten Pilze nicht von den mit ARG angezüchteten unterscheiden. CBS 6094 wird durch die UVA-Applikation im Wachstum eingeschränkt, aber im Vergleich zu allen anderen untersuchten Pilzstämmen ist kein Wachstumsunterschied zwischen den beiden Vergleichsgruppen feststellbar. Hieraus kann man schlußfolgern, daß nicht TRP, sondern seine Derivate das aktive Prinzip des Lichtschutzes darstellen. Bei näherer Differenzierung stellte sich heraus, daß CBS 6094 vermutlich *M. sympodialis* ist (Mayser und Raabe). Nach einer Applikation von 100 J cm^{-2} UVA verringert sich das Wachstum auf 78% (entspricht 112 Mio./unbelichtete Kontrollen mit 142 bzw. 143 Mio.) unabhängig von der Stickstoffquelle

(Abbildung 14). Dieser Trend setzt sich bei weiterer Erhöhung fort (150 J cm⁻² UVA entspricht einer Wachstumsreduktion auf 62%=90 Mio. und 200 J cm⁻² UVA entspricht einer Wachstumsreduktion auf 41%=59 Mio.).

Abbildung 14: Graphische Darstellung CBS 6094 - UVA



4.3. Medium mit UVB-Bestrahlung einmalig und kumulativ

In den folgenden Abbildungen werden die Ergebnisse der einmaligen (1. Abbildung) und kumulativen (2. Abbildung) UVB-Bestrahlung graphisch dargestellt. Die Hefen wurden einmalig mit 100, 500, 1000, 1500, 2000 mJ cm⁻² UVB bestrahlt bzw. an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit derselben UVB-Dosis (100, 300, 500 mJ cm⁻²) kumulativ belichtet.

UVB Bestrahlungsschema (einmalig):

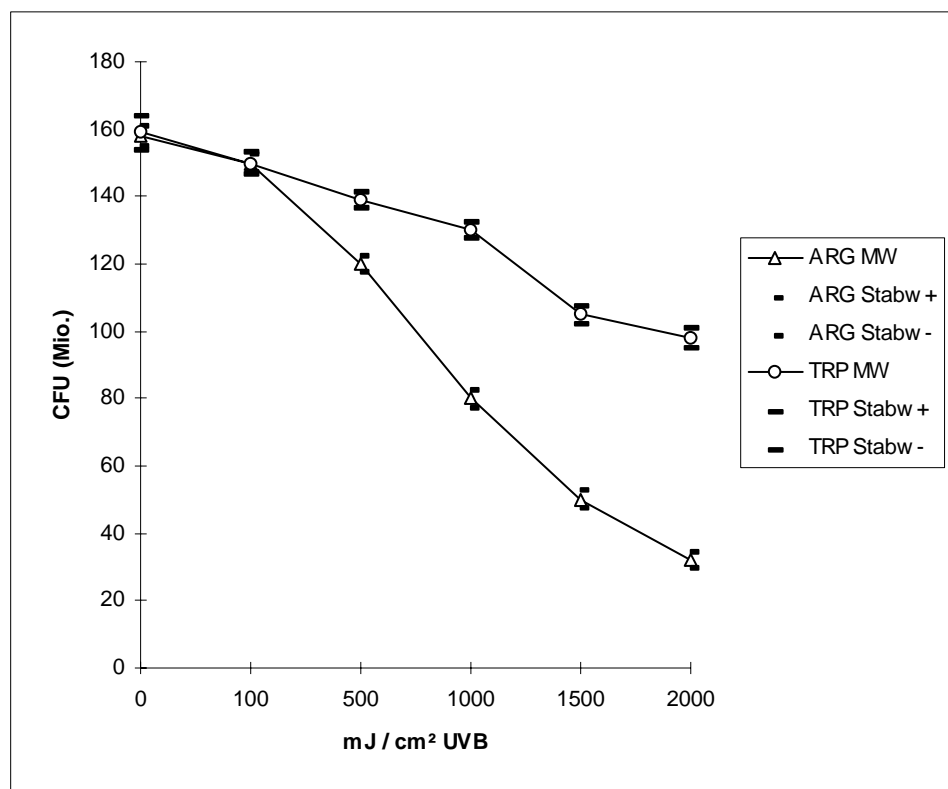
0, 100, 500, 1000, 1500, 2000 mJ cm⁻² UVB

UVB Bestrahlungsschema (kumulativ):

0, 500, 1500, 2500 mJ cm⁻² UVB

In den Graphiken wird die UVB-Dosis in mJ cm^{-2} angegeben. Die Meßergebnisse wurden in einer x/y-Graphik dargestellt (s.o.). Im Anhang sind die einzelnen Meßergebnisse in tabellarischer Aufstellung aufgeführt. Einige der aufgeimpften Pilze sind gar nicht gewachsen. Bei den Berechnungen wurden die Nullwerte mit in die Rechnung einbezogen. Aus diesem Grund sind die Standardabweichungen bei einigen Untersuchungen höher als bei anderen. Die untersuchten pigmentproduzierenden *M. furfur*-Stämme zeigten eine unterschiedlich stark ausgeprägte UV-Resistenz. Gerade in den hohen UVB-Bereichen waren die Wachstumsunterschiede bei den verglichenen Gruppen signifikant ($p < 0,0001$).

Abbildung 15: Graphische Darstellung CBS 7019- UVB (einmalig)

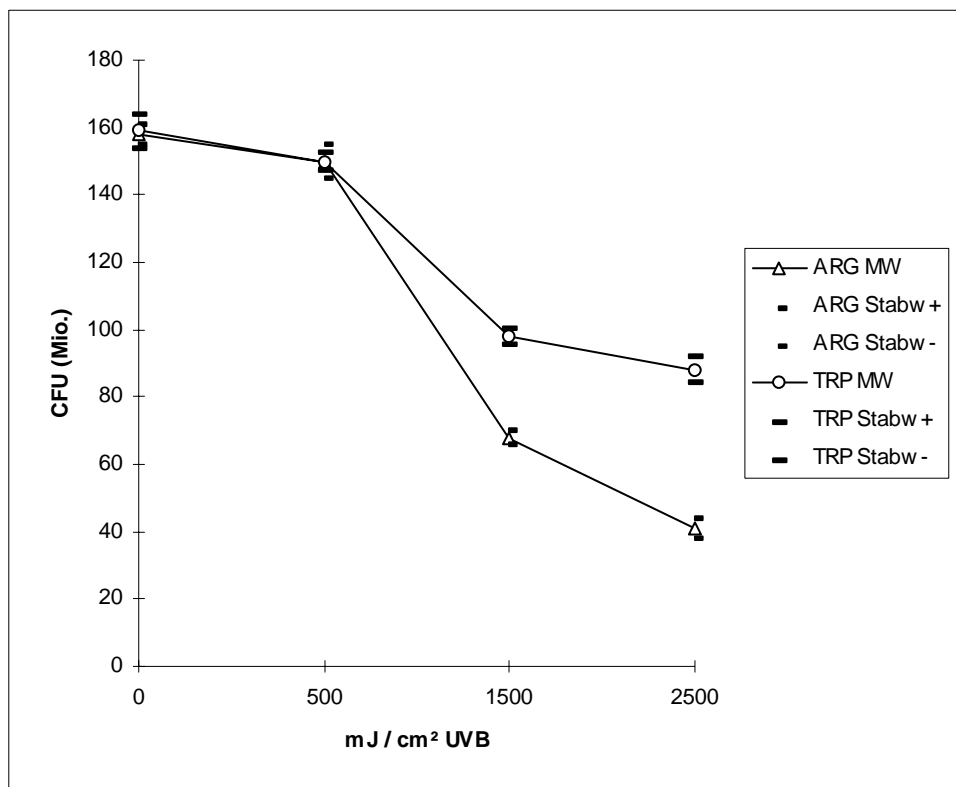


Nach einer einmaligen UVB-Bestrahlung mit 100 mJ cm^{-2} (Abbildung 15) hat sich das Wachstum beider Gruppen zu fast gleichen Teilen im Vergleich zu den unbelichteten Kontrollen nur minimal reduziert (unbelichtete Kontrollen: ARG=158 Mio. und TRP=159 Mio.; 100 mJ cm^{-2} : ARG=150 Mio. und TRP=150 Mio.) Bei einer Verfünffachung der

Strahlendosis auf 500 mJ cm^{-2} ist ein hochsignifikanter Wachstumsunterschied ($p < 0,0001$) zu verzeichnen. Eine weitere Erhöhung der UVB-Dosis führt zu einer immer stärkeren Wachstumsabnahme der Pilze.

Bei einer mehrtägigen Bestrahlung mit je 500 mJ cm^{-2} UVB (insgesamt 2500 mJ cm^{-2}) verringert sich das Wachstum bei den mit ARG angezüchteten Zellen auf 41 Mio. und bei den mit TRP angezüchteten Pilzen auf 88 Mio.

Abbildung 16: CBS 7019 - UVB (kumulativ)



(Abbildung 16) im Vergleich zu den unbelichteten Kontrollen (ARG=158 Mio. und TRP=159 Mio.). Wie zu erwarten, ist die Wachstumsreduktion bei einer 5 mal wiederholten UVB-Dosis von 500 mJ cm^{-2} wesentlich größer als bei einer einmaligen UVB-Dosis von 500 mJ cm^{-2} (ARG=120 Mio. und TRP=139 Mio.).

Abbildung 17: Graphische Darstellung CBS 6046 - UVB (einmalig)

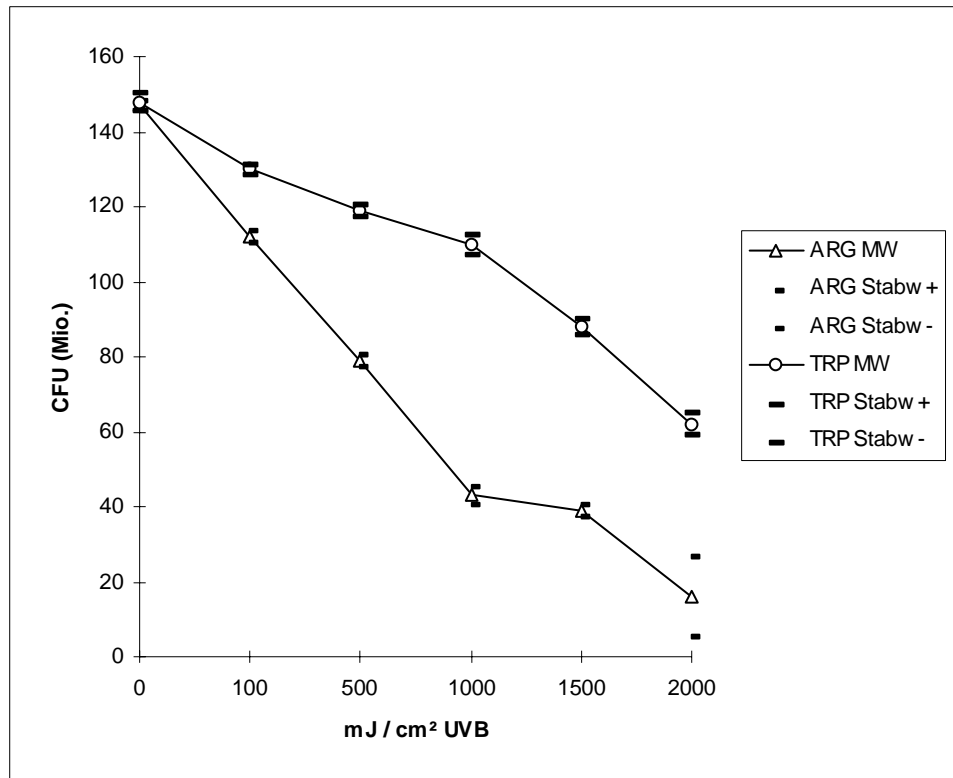
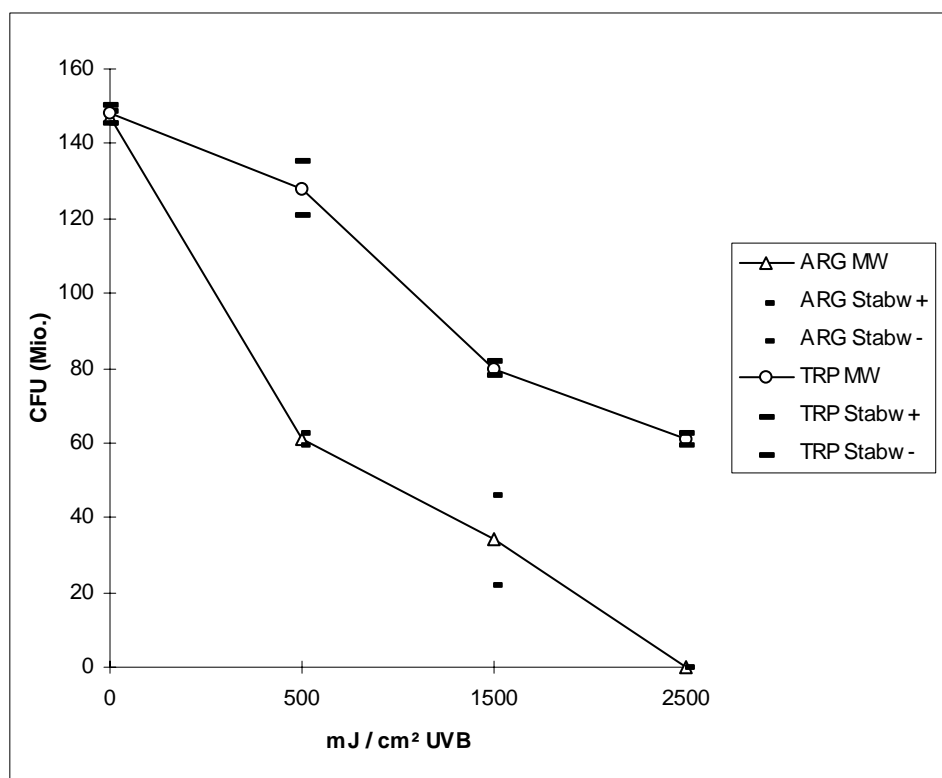


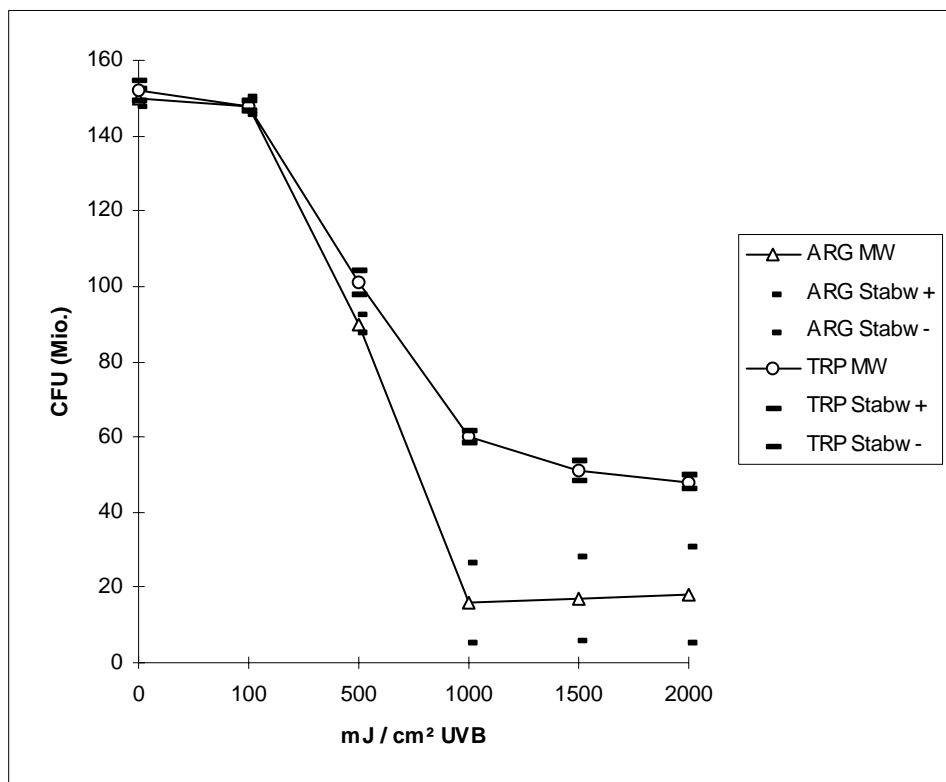
Abbildung 18: CBS 6046 - UVB (kumulativ)



Bei einer UVB-Applikation von 1000 mJ cm^{-2} (Abbildung 17) beträgt die Wachstumsdifferenz zwischen beiden Versuchsreihen 45% (1000 mJ cm^{-2} : ARG=29%=43 Mio. und TRP=74%=110 Mio.). Bei 2000 mJ cm^{-2} UVB wachsen bei den mit ARG angezüchteten Hefen 16 Mio. und bei der Vergleichsgruppe 62 Mio..

Für die mehrtägigen Bestrahlungen mit insgesamt 1500 mJ cm^{-2} UVB (Abbildung 18) ergibt sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p < 0,0001$). Die auf ARG angezüchteten Hefen sind auf 41% (61 Mio.) bzw. bei TRP auf 86% (128 Mio.) abgesunken. Bei 2500 mJ cm^{-2} UVB ist bei den mit ARG angezüchteten Hefen kein Wachstum mehr zu verzeichnen.

Abbildung 19: Graphische Darstellung CBS 4162 - UVB (einmalig)



Bei einer Applikation von 1000 mJ cm^{-2} (Abbildung 19) ergibt sich eine große Wachstumsreduktion beider Gruppen. Die mit TRP angezüchteten Hefen fallen auf 60 Mio.

und die mit ARG angezüchteten auf 16 Mio. ab. Bei einer Verdopplung der UVB-Dosis bleibt die Zellzahl bei den mit ARG angezüchteten Hefen nahezu konstant bestehen. Die Standardabweichungen sind so hoch, weil die aufgeimpften Pilze teilweise nicht gewachsen sind und die Nullwerte in die Berechnung mit einbezogen werden.

Abbildung 20: CBS 4162 - UVB (kumulativ)

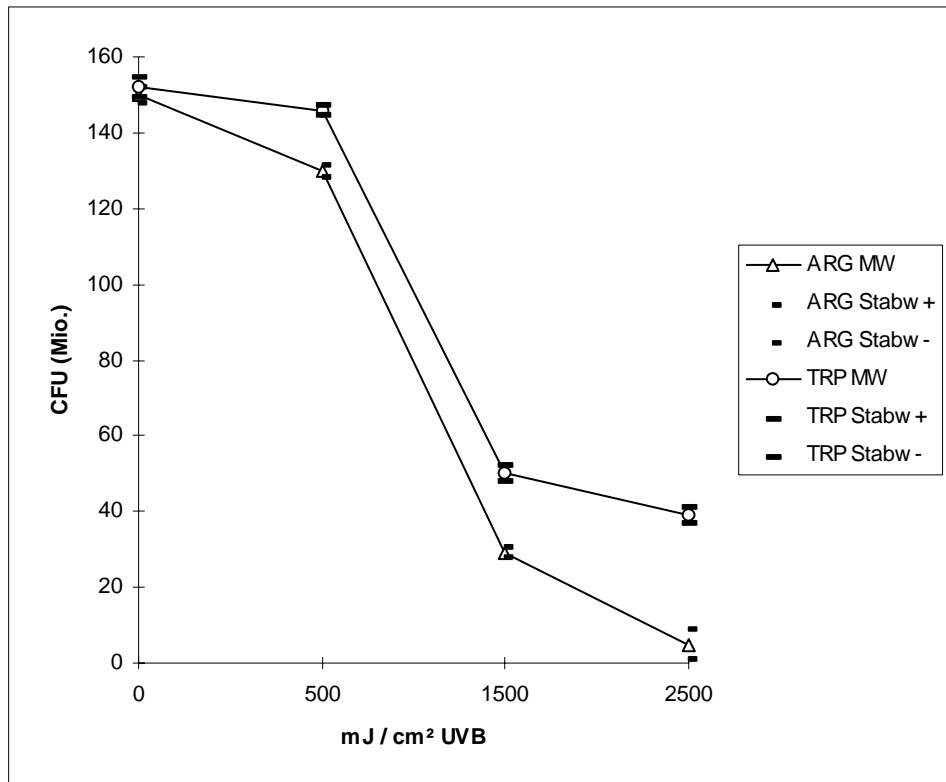
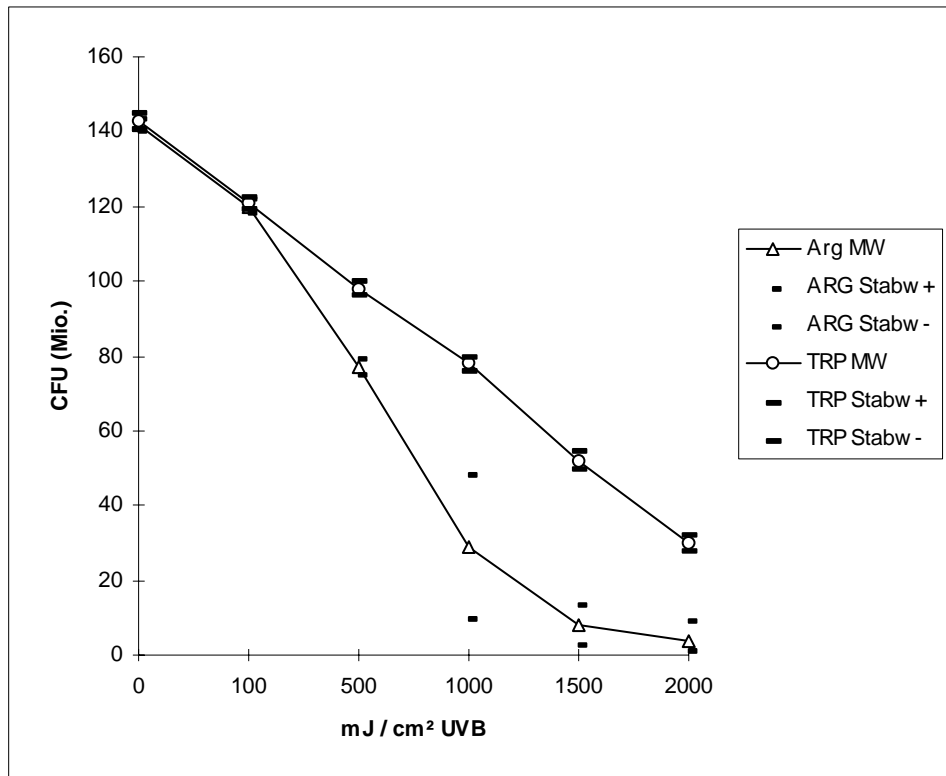


Abbildung 20 zeigt, daß bei einer kumulativen UVB-Dosis von 500, 1500 und 2500 mJ cm⁻² die Wachstumsunterschiede bei beiden Gruppen hochsignifikant unterschiedlich sind. Bei 2500 mJ cm⁻² ist das Wachstum auf 3% bei den mit ARG angezüchteten Hefen (5 Mio.) und auf 26% (39 Mio.) bei der Vergleichsgruppe abgesunken.

Bei einer UVB-Dosis von 1000 mJ cm⁻² (Abbildung 21) ist der Wachstumsunterschied zwischen beiden Gruppen (TRP=55%=78 Mio. und ARG=20%=29 Mio.) signifikant ($p=0,0029$), und dieser Trend setzt sich bis zur höchsten gemessenen UVB-Einzelapplikation von 2000 mJ cm⁻² weiter fort (TRP=21% d.h. 30 Mio. und ARG=3% d.h. 4 Mio.; $P=0,0005$). Bei den auf Arginin angezüchteten Hefen sind die Standardabweichungen bei den UVB-

Applikationen 1000, 1500 und 2000 mJ cm^{-2} UVB so hoch, weil die aufgeimpften Pilze teilweise nicht gewachsen sind, die Nullwerte wurden aber in die Berechnungen mit einbezogen. Im Vergleich zu den anderen untersuchten Pilzstämmen ist der auf ARG angezüchtete Wildstamm 397 im UVB-Bereich 2000 mJ cm^{-2} am UV-sensitivsten.

Abbildung 21: Graphische Darstellung Wildstamm 397 - UVB (einmalig)



Hochsignifikante Unterschiede ($p=0,0006$) finden sich (Abbildung 22) bei einer kumulativen Dosis von 1500 mJ cm^{-2} UVB (unbelichtete Kontrollen ARG/TRP entspricht 142 Mio./143 Mio. und bei 1500 mJ cm^{-2} ARG/TRP entspricht 30 Mio./51 Mio.). Eine Erhöhung der kumulativen Dosis auf 2000 mJ cm^{-2} UVB schränkt das Wachstum der auf ARG angezüchteten Pilze vollkommen ein (0 Mio.), während hingegen die auf TRP angezüchteten Pilze noch wachsen (38 Mio.).

Abbildung 22: Wildstamm 397 - UVB (kumulativ)

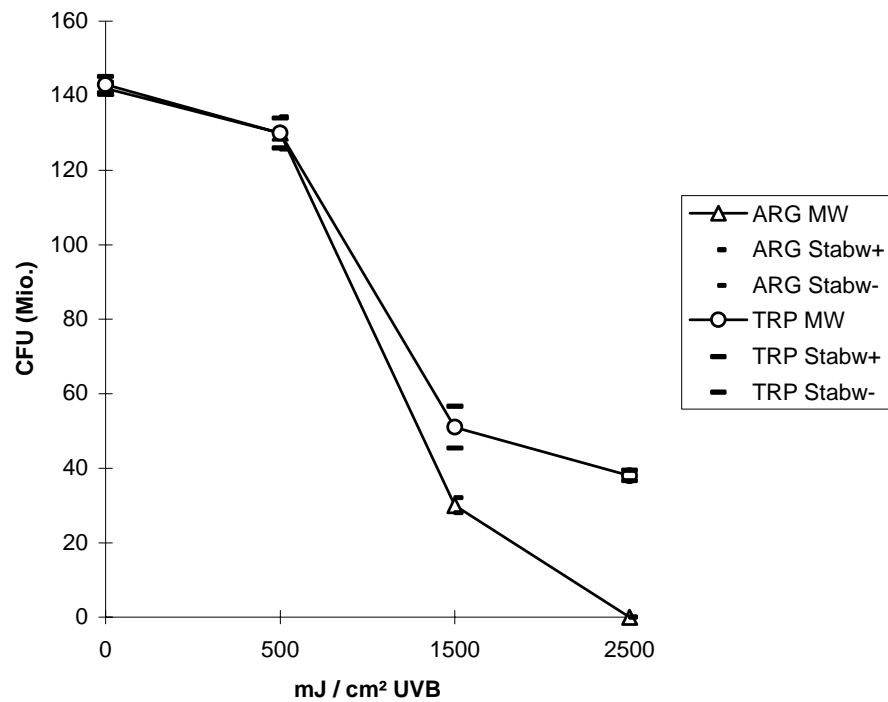
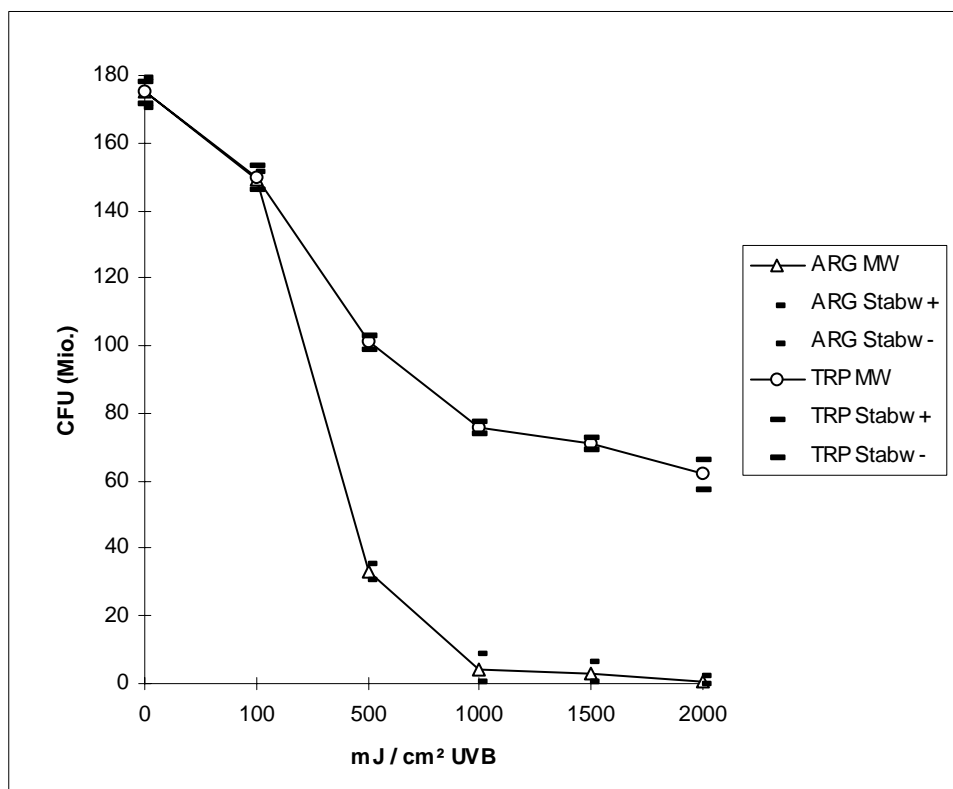
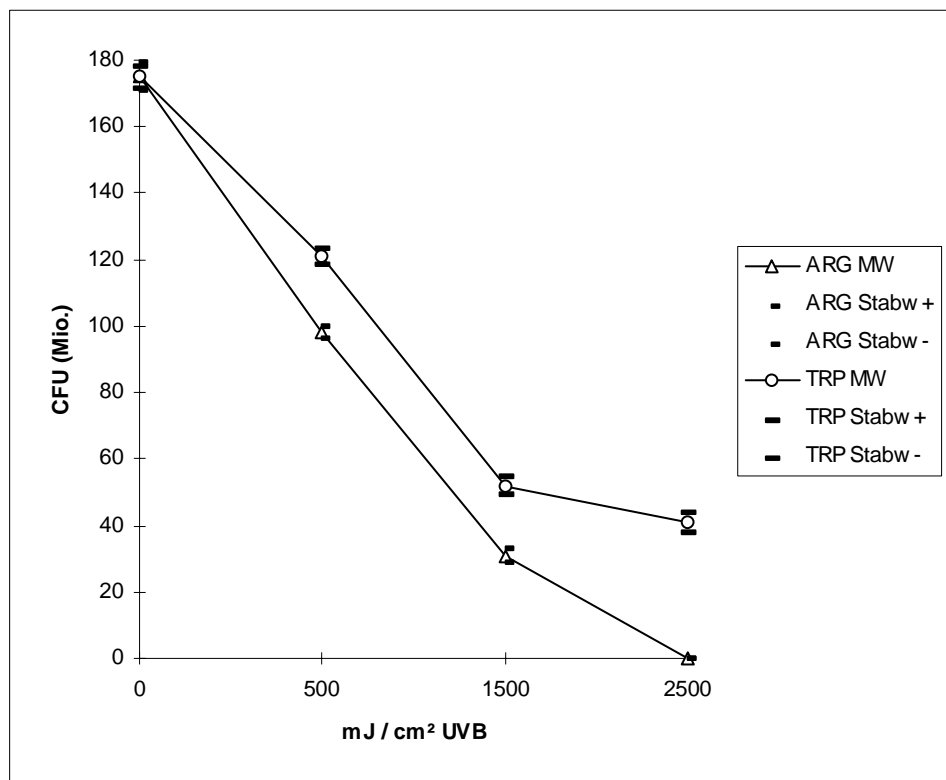


Abbildung 23: Graphische Darstellung CBS 1878 - UVB (einmalig)

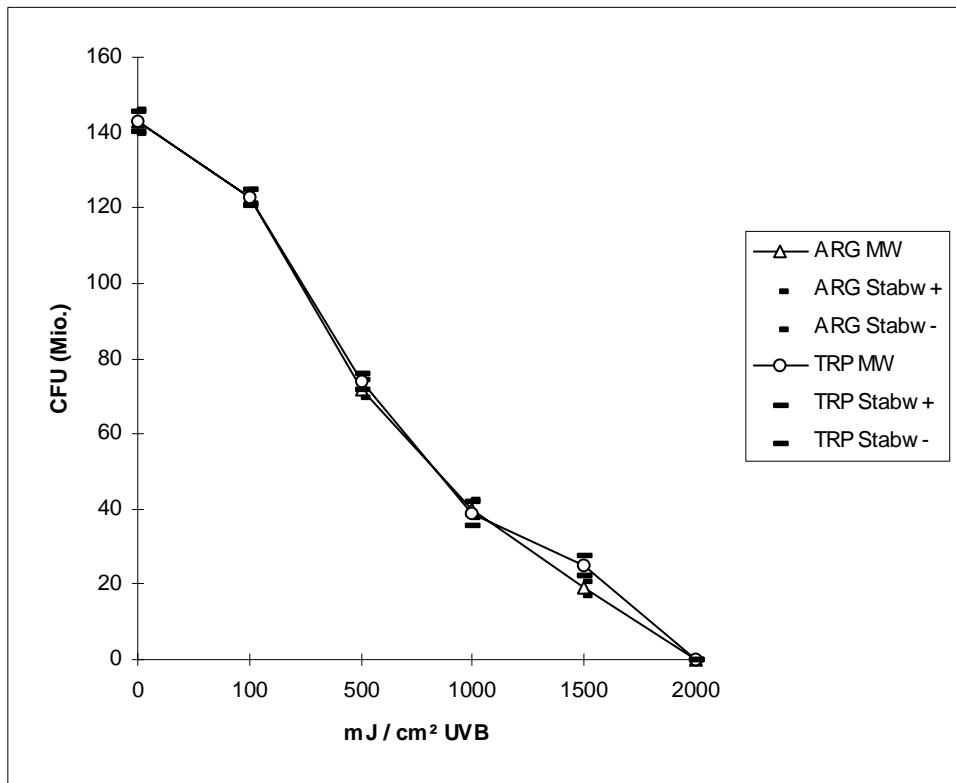
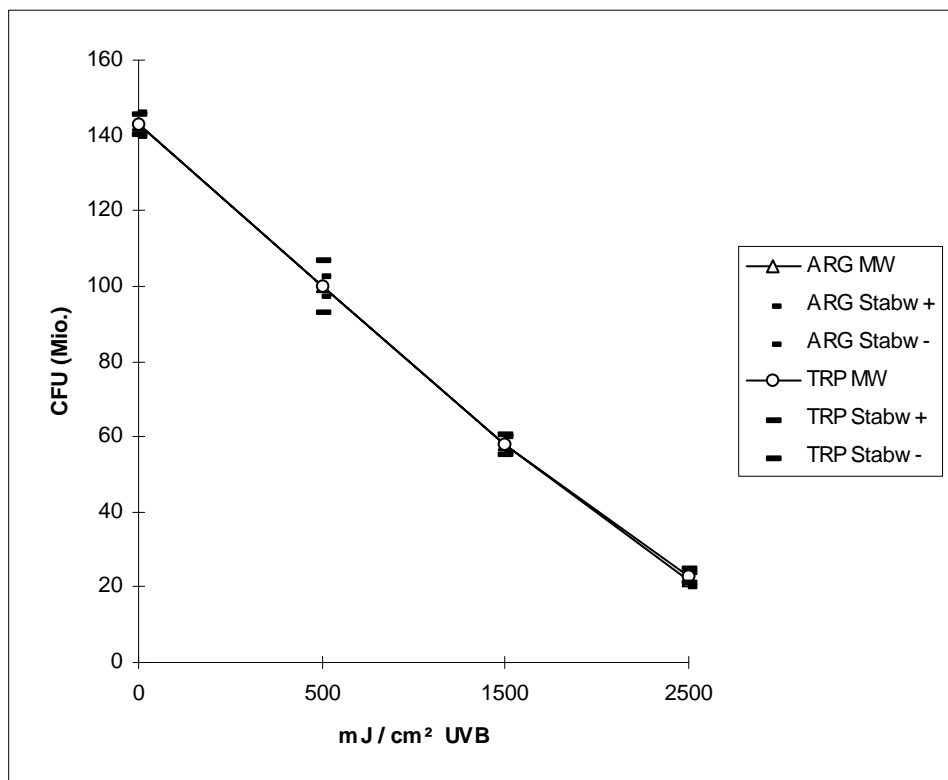


Die Applikation von 500 mJ cm^{-2} führt zu einem signifikanten Unterschied (Abbildung 23) zwischen den mit ARG bzw. TRP angezüchteten Hefen ($p < 0,0001$). Dieser signifikante Unterschied bleibt bis mindestens 2000 mJ cm^{-2} bestehen. Bei einer einmaligen UVB-Applikation von 1000 mJ cm^{-2} und mehr zeigen die mit ARG angezüchteten Pilze fast kein Wachstum mehr, während hingegen CBS 1878 mit TRP angezüchtet bei denselben UV-Dosen noch wächst.

Abbildung 24: CBS 1878 - UVB (kumulativ)



Bei einer insgesamt 5-tägigen Bestrahlung (Abbildung 24) mit je 500 mJ cm^{-2} UVB, also insgesamt 2500 mJ cm^{-2} ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den mit ARG und TRP angezüchteten Stämmen ($p < 0,0001$). Die mit ARG angezüchteten Stämme zeigen kein Wachstum mehr (0 Mio.), wohingegen die mit TRP angezüchteten noch wachsen (41 Mio.).

Abbildung 25: Graphische Darstellung CBS 6094 - UVB (einmalig)**Abbildung 26: CBS 6094 - UVB (kumulativ)**

Wie schon in der Abbildung 14 beschrieben ist auch bei der einmaligen UVB-Applikation kein Wachstumsunterschied zwischen den Vergleichsgruppen zu verzeichnen (Abbildung 25). Unabhängig von der Stickstoffquelle ist bei 2000 mJ cm^{-2} UVB kein Wachstum mehr vorhanden.

Bei der kumulativen UVB-Applikation (Abbildung 26) setzt sich der Trend, der sich schon in der vorherigen Graphik abzeichnet, weiter fort. Eine kumulative UVB-Applikation von 500 mJ cm^{-2} reduziert das Wachstum auf 70% (entspricht 100 Mio.) unabhängig von der Stickstoffquelle. Bei weiterer Erhöhung der UVB-Applikation steigt die Wachstumsreduktion wie erwartet an. Die kumulative Dosis von insgesamt 2500 mJ cm^{-2} senkt das Wachstum auf 15% (entspricht 22 Mio.).

4.4. Pilzextrakt

Die folgende Graphik (Abbildung 27) zeigt das UV-Spektrum des auf die Haut aufgetragenen Rohextraktes bei 1: 500-Verdünnung. Wie im Material- und Methodenteil unter 3.6.1. geschildert konnte man mittels Ethylacetat und Ethanol aus dem Pilz einen Rohextrakt gewinnen. Die Extinktion dieses mit Ethanol verdünnten Extraktes wurde bei unterschiedlicher Wellenlänge gemessen. Auf der x-Achse ist die Wellenlänge in nm dargestellt und auf der y-Achse die der Wellenlänge entsprechende Absorption. In der Tabelle 13 sind die Absorptionswerte den entsprechenden Wellenlängen gegenübergestellt. Im Anhang finden sich die Ergebnisse zweier anderer Verdünnungsstufen (1:100 und 1:1000).

Abbildung 27: Absorptionswerte des Pilzextraktes

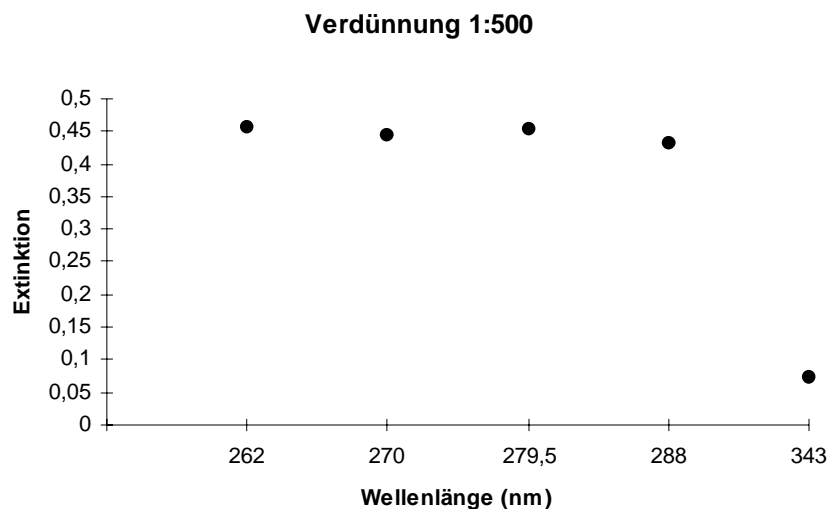


Tabelle 13: Wellenlänge und Extinktion des Rohextraktes

| Wellenlänge | Extinktion |
|-------------|------------|
| 343,0 | 0,073 |
| 288,0 | 0,433 |
| 279,5 | 0,455 |
| 270,0 | 0,444 |
| 262,0 | 0,458 |

4.5. UV-Filter bei äußerer Anwendung am Menschen

Der unter 3.7. beschriebene Versuchsaufbau erbrachte folgendes Ergebnis.

Tabelle 14: UV-Schutz des auf die Haut aufgetragenen Rohextraktes

| Testperson | MED | mit Extrakt | ohne Extrakt | abge waschen |
|------------|------|--------------|--------------|--------------|
| 1 | 62,5 | Rötung | Rötung | Rötung |
| 2 | 46 | keine Rötung | Rötung | Rötung |
| 3 | 50 | keine Rötung | Rötung | Rötung |

Bei den Hautpartien, an denen der Pilzextrakt aufgetragen worden ist, war keine Rötung zu sehen. Nur die ungeschützte Haut rötete sich (Abbildung 28 und Tabelle 14).

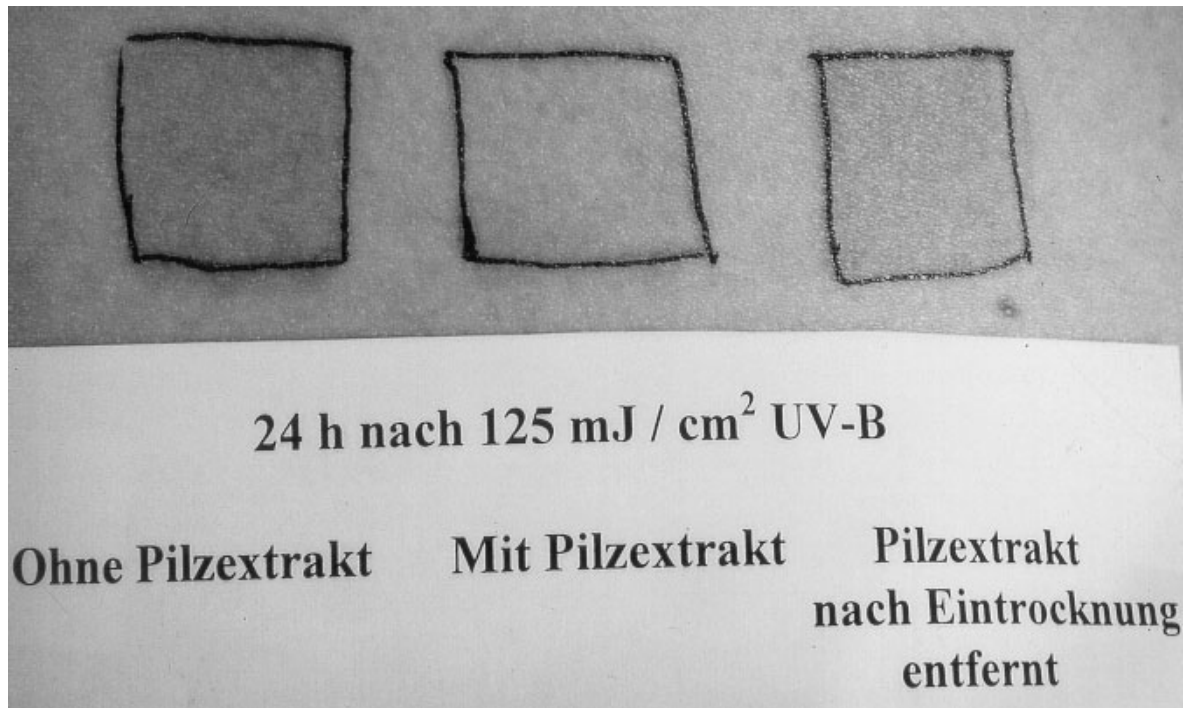


Abbildung 28: Dermis 24 h nach UVB-Bestrahlung mit und ohne Rohextrakt

5. Diskussion

In der Vergangenheit konnte festgestellt werden, daß *Malassezia furfur* als einzige unter den bekannten Spezies der Gattung *Malassezia* auf einem Nährmedium, das nur aus der Aminosäure Tryptophan (TRP) und einer Lipidquelle besteht, ein braunes in den Agar diffundierendes Pigment bilden kann. Dieses Pigment fluoresziert im UV-Licht (Mayser und Wille 1998). Die Pigmentbildung ist nur möglich, wenn TRP als Stickstoffquelle vorhanden ist. Die Lipidquelle ist austauschbar.

Unter diesen Wachstumsbedingungen bildet *M. furfur* dunkel-schwarz-braune Kolonien. Der Agar färbt sich leicht bräunlich und fluoresziert im UV-Licht.

Mayser und Wille konnten mit ihren Untersuchungen einen vollkommen neuartigen Stoffwechselweg des *M. furfur* feststellen. Der Stoffwechselweg ist bis heute noch nicht vollständig geklärt, aber er spielt bei der Klärung der Pathogenese der Pityriasis versicolor möglicherweise eine bedeutsame Rolle. In der Vergangenheit ist es gelungen, das Pigment aus dem Nährboden zu extrahieren und weiter zu analysieren. Typischerweise treten bei der Pityriasis versicolor polychrome scheckige und schuppige Hautläsionen auf, die im Woodlicht ocker-farben bis bräunlich fluoreszieren (Balus 1982). Aufgrund der Vielzahl von roten bis braunroten Farbstoffen, die im Rohextrakt nachweisbar sind (Mayser und Wille 1998), ist es naheliegend den neu entdeckten Stoffwechselweg mit dem klinischen Erscheinungsbild der Pityriasis versicolor zu verbinden. Eventuell spiegeln die einzelnen im Extrakt nachgewiesenen Farbstoffe verschiedene Phasen der Erkrankung wieder.

Mit den Ergebnissen, die dieser Arbeit zugrundeliegen, wird in einem Modell nachgewiesen (Mayser und Pape 1998), daß die von *M. furfur* gebildeten Pigmente und Fluorochrome einen chemischen Filter herstellen können, der *M. furfur* vor dem einfallenden UV-Licht schützt.

M. spezies sind Teil der Standardflora menschlicher Haut (Yarrow 1984; Ingham 1993; Gueho 1996; Hay 1992). Sie leben saprophytisch auf der Haut vieler Gesunder (Balus 1982) und besiedeln hauptsächlich die oberen Hautschichten (Epidermis). Sie sind damit verstärkt dem UV-Licht ausgesetzt. Man nimmt an, daß das Wachstum der Pilze durch die einfallenden UV-Strahlen gefährdet und eingeschränkt sein könnte.

Wikler et al. zeigte 1989, daß das Wachstum von *Pityrosporum*-Hefen (heute *Malassezia*) durch UV-Licht eingeschränkt wird. Anders als bei den dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimenten wurden die Pilze als Suspension auf Dixon-Standardplatten aufgetragen und durch Schwenken der Petrischale auf dem gesamten Agar verteilt. Anschließend wurden die

Platten mit 25, 50, 75 J/cm² UVA und bis 900 mJ/cm² UVB bestrahlt. Bereits drei Tage nach der UV-Exposition wurden die Einzelkolonien der Pilze ausgezählt und mit Kontrollansätzen, die keiner Bestrahlung ausgesetzt waren, verglichen. Wikler et al. fanden signifikante Unterschiede bezüglich des Pilzwachstums. Elektronenmikroskopisch konnten sie ultrastrukturelle Veränderungen wie Verklumpungen der Ribosomen und aufgelöste Zellkerne nachweisen. Das Wachstum der verwendeten *M. spezie*s war durch die UV-Exposition in vitro eindeutig gehemmt worden.

Faergemann konnte bereits 1986 zeigen, daß viele verschiedene Mikroorganismen, die aber alle zur Standardflora der menschlichen Hautoberfläche zählen, auf UVA- oder UVB-Exposition mit einem Einbruch in der Wachstumskurve reagierten. *Pityrosporum orbiculare* reagierte aber im Vergleich zu den anderen untersuchten Organismen wie *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* auf UVB-Licht am empfindlichsten. Der diesen Versuchen zugrundeliegende UVB-Bereich lag bei 65, 123, 250 und 900 mJ cm⁻². In dem den Versuchen zugrundeliegenden UVA-Bereich (25, 50 und 75 J cm⁻²) wurde nur das Wachstum von *P. orbiculare* sichtbar gehemmt. Rivers führte 1988 in vivo eine Doppelblindstudie mit *M.*-Hefen durch. Die Kontrollgruppe wurde sichtbarem Licht (31 J cm⁻²) ausgesetzt, und die anderen wurden mit UVA-Licht mit einem geringen Anteil UVB bestrahlt (insgesamt 34 J cm⁻²). Die Zahl der *Malassezia*-Hefen (*Pityrosporum*) war nach der UV-Exposition verringert. Es läßt sich also aufgrund der oben geschilderten Tatsachen schlußfolgern, daß die *Malassezia* Hefen sehr empfindlich auf UV-Licht reagieren. Ein UV-Filter könnte für die Mikroorganismen einen großen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Organismen, die ebenfalls sehr oberflächlich lokalisiert sind, nach sich ziehen. Eventuell wären die *M.*-Hefen anderen Pilzen oder Bakterien der menschlichen Standardflora überlegen, sofern sich diese nicht auch an die verstärkte UV-Exposition adaptiert haben.

In dieser Arbeit wurde in einem Modell nachgewiesen, daß die von *M. furfur* gebildeten Pigmente und Fluorochrome einen möglichen UV-Schutz in Form eines chemischen Filters darstellen können. Die zu untersuchenden fünf Referenzstämme und ein Wildisolat von *M. furfur* wurden sechs Tage auf einer Variante des m-Dixon-agar angezüchtet. Die Stickstoffquelle Pepton wurde durch Arginin (ARG) bzw. Tryptophan (TRP) ersetzt. Anschließend wurden die Hefezellen geerntet, in 0,9 % iger Kochsalzlösung gewaschen und in mehreren Impfpunkten mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen auf m-Dixon-agar mit Pepton verimpft. Unmittelbar danach wurden die Pilze mit UVA (100, 150 und 200 J cm⁻² einmalige Dosis) bzw. UVB (100, 500, 1000, 2000 mJ cm⁻² einmalige Dosis, 500, 1500, 2500 mJ cm⁻²

kumulativ) exponiert. Die Kontrollplatten wurden nicht bestrahlt. Unabhängig von der Stickstoffquelle wuchsen die nicht UV-Licht ausgesetzten Kontrollansätze nach fünf Tagen in identischer Größe. Unter UVA- und UVB-Exposition traten Unterschiede in den Wachstumsraten auf. Bei den auf TRP angezüchteten Hefen war das Wachstum weniger stark eingeschränkt als bei denen auf ARG-haltigem Medium. Die Unterschiede zwischen den beiden Wachstumsraten der jeweiligen Pilzstämme waren besonders in den hohen UVA- und UVB-Bereichen signifikant ($p < 0,0001$). Die einzelnen Referenzstämme reagierten nicht alle gleich stark UV-lichtempfindlich. Der Wildstamm 397 wies die geringste UV-Resistenz auf. CBS 6094 zeigte keine Pigmentbildung und auch keine Unterschiede im Wachstumsverhalten unter UVA- bzw. UVB-Licht. Diese Ergebnisse zeigen, daß *M. furfur* tatsächlich nur mit Tryptophan Pigmente bildet, die einen wirksamen UV-Filter darstellen und daß es *Malassezia*-Stämme gibt, die keine UV-Filter bilden können. Sie sind möglicherweise anderen *M. spezie*s zuzuordnen.

Analog zu *M. furfur* haben sich auch andere Pilze an eine verstärkte UV-Exposition adaptiert. *Herpotrichiellaceae* und *Pleosporaceae* zählen zu den Ascomyzeten und können zum Krankheitsbild der Phaeohyphomycosen führen (Hoog 1995; Polak 1990). Diese Krankheitserreger bilden über Dihydroxynaphthalene und ein verwandtes Pentaketid Melanin (Taylor 1987). Aufgrund ihrer ständigen dunkel-schwarz-braunen Pigmentierung werden sie "Dematiaceen" genannt, was soviel wie Schwärzepilze bedeutet.

Das Pigment Melanin kommt in der Natur vor, und es übernimmt verschiedene Funktionen. Polak untersuchte 1990 die pathogenetischen Mechanismen des Melanins. Sie zeigte, daß die Melaninsynthese nicht nur einen UV-Schutz, sondern auch eine geringere Anfälligkeit gegen Phagozytose bewirkt. Neben den Schwärzepilzen synthetisieren noch weitere Mikroorganismen Melanin. Zu erwähnen ist *Filobasidiella neoformans* (Anamorphe *C. neoformans*). Sie gehört zu der Klasse der Heterobasidiomyceten und benutzen Phenoloxidasen zur Melaninproduktion (Polachek 1988). Melanin verstärkt ihre Pathogenität und schützt sie vor UV-Licht (Wang 1994). Die Melaninsynthese ist aber abhängig von den Nährstoffbedingungen. Die erwähnten Mikroorganismen sind auf Dopa und andere Phenole angewiesen. Nur dann ist eine kontinuierliche Melaninsynthese gewährleistet (Polachek 1982).

Simmons konnte 1987 zeigen, daß *M.*-Hefen zu den Basidiomyceten zu zählen sind, weil sie, ebenso wie *Filobasidiella neoformans*, zu einer positiven Diazonium-blau-Reaktion führen und denselben ultrastrukturellen Zellwandaufbau besitzen wie *Filobasidiella*

neoformans. Aber die *Malassezia*-Hefen stimmen noch in anderen Punkten mit *Filobasidiella neoformans* überein. Wie sie können auch *M. furfur* nur unter bestimmten nutritiven Voraussetzungen Pigmente und Fluorochrome bilden. TRP muß als alleinige Stickstoffquelle vorhanden sein (Mayser und Wille 1998). Derzeit ist der Stoffwechselweg selbst sowie die Bedeutung für *M. furfur* noch unklar. Es scheint, als spiele die Verstoffwechslung des Tryptophan eine Rolle bei der Pathogenese der Pityriasis versicolor (Mayser, Wille 1998). Möglich wäre, daß die von *M. furfur* gebildeten Tryptophan-Derivate in das Immunsystem des Wirts eingreifen analog zu *Cryptococcus neoformans*.

In dieser Arbeit konnte experimentell nachgewiesen werden, daß die gebildeten Tryptophan-Derivate des *M. furfur* einen potenten UV-Filter darstellen. Die bereits erwähnten Schwärzepilze produzieren kontinuierlich Melanin, wohingegen *M. furfur*, wie *Filobasidiella neoformans*, nur unter bestimmten nutritiven Voraussetzungen diesen Stoffwechselweg einschlägt. Denkbar wäre, daß der Stoffwechselweg viel Energie kostet, die dem Pilz nicht ohne weiteres im Überfluß zur Verfügung steht. Es zeichnet sich ab, daß die relative Anreicherung von Tryptophan bei Verlust anderer Stickstoffquellen, der Impuls für die Pigmentbildung des *M. furfur* ist. Bei exzessivem Schwitzen könnten derartige Bedingungen auf der menschlichen Haut entstehen. Das Abtropfen ekkrinen Schweißes führt zum Verlust hydrophiler Stickstoffquellen und der meisten Aminosäuren (Liappis 1980). Tryptophan ist eine heterozyklische Aminosäure mit starker hydrophober Struktur. Die Strukturformel dieser AS ist für die Bindung der Aminosäure an Proteine wie Albumin im Blut verantwortlich (Mc. Menamy 1958). Tryptophan könnte auch in der Haut ebenso wie im Blut eine derartige Proteinbindung eingehen. Vor allem deshalb, weil Tryptophan aufgrund seines UV-Spektrums auch einen natürlichen UV-Filter darstellen könnte (Sadler 1980). Die relative Anreicherung von Tryptophan nach starkem Schwitzen täuscht Wärme und UV-Belastung vor. *M. furfur* reagiert darauf zum eigenen UV-Schutz und Wachstumsvorteil gegenüber Konkurrenten mit der Synthese Tryptophan-abhängiger Pigmente.

Bei den Untersuchungen dieser Arbeit wurden die UV-Dosen höher gewählt als bei bisherigen in vitro Untersuchungen zur UV-Empfindlichkeit von *Malassezia*-Hefen (Wikler 1990; Faergemann 1986). Aufgrund anderer zur Verfügung stehender Technik waren die Einzel- und Kumulativdosen im UVA- und UVB-Bereich zwar höher aber dennoch nicht unrealistisch hoch. Einerseits können die ausgewählten UV-Dosen durchaus an einem sonnigen Tag in den Sommermonaten in Mitteleuropa erreicht werden und andererseits sollte überprüft werden, bei welcher UV-Intensität die Hefen schließlich absterben. Bei den höheren

UV-Intensitäten waren die Wachstumsunterschiede signifikant different. Besonders in den höheren UV-Bereichen wurde deutlich, wie wirksam der aus Tryptophan-Derivaten gebildete UV-Schutz wirklich ist.

Der in dieser Arbeit nachgewiesene UV-Schutz der durch Verstoffwechslung von Tryptophan gebildeten Pigmente hat auch einen Bezug zur Klinik der Pityriasis versicolor. In diesem Zusammenhang war zunächst das Krankheitsbild der Pityriasis versicolor alba von Interesse. Es ist die hypopigmentierte Form. Sie besteht wesentlich seltener als die hyperpigmentierte Form der Pityriasis versicolor. Typischerweise bilden sich bei diesem Krankheitsbild weiße Läsionen auf der Epidermis. Vitiligo ist eine oft erwähnte Differentialdiagnose (Hay 1992, Lockshin 1973). Aufgrund eines autoimmunologisch bedingten Melanozytenverlustes fehlt den Epidermiszellen das vor UV-Licht schützende Melanin. Die Folge sind häufig auftretende Sonnenbrände in den nicht pigmentierten weißen Hautregionen. El-Gothamy (1975) und Ruete (1933) beobachteten auch bei Pityriasis versicolor alba eine Einschränkung der Dopa-Reaktion und Melaninsynthese. Obwohl das Krankheitsbild in tropischen Regionen weit verbreitet ist und bis zu 50 % der Bevölkerung betroffen ist (Hay 1992), wurde das Auftreten von Sonnenbränden bei an Pityriasis versicolor alba-Erkrankten nur selten beschrieben. Es konnte mit künstlichem UV-Licht kein Sonnenbrand in den weißen Flecken induziert werden, wie Experimente aus dem frühen Jahrhundert zeigen (Wertheim 1923, Ruete 1933). Bereits 1936 fanden zwei Forscher heraus, daß die Hautschuppen von Pityriasis versicolor-Patienten einen UV-Filter besitzen (Lewis 1936).

Über Jahre hinweg war nicht bekannt, welcher Art der Lichtfilter ist. Es konnte sowohl ein physikalischer als auch ein chemischer UV-Filter sein. Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimente machen deutlich, daß es sich um einen chemischen Filter handelt. Der Filter ist immanent vorhanden. Selbst mehrmaliges Waschen mit NaCl und Zentrifugieren kann ihn nicht von den Mikroorganismen ablösen.

Bis heute ist noch nicht nachgewiesen, wo sich das Melanin in den Zellen befindet. Möglicherweise befindet es sich in der Zellwand wie bei *Exophiala spp.* (Polak 1990) oder aber im Zellinneren.

Hervorzuheben ist, daß nicht Tryptophan selbst, sondern seine nach Verstoffwechslung durch den Pilz gebildeten Derivate den UV-Schutzfilter bewirken. Nicht jede *Malassezia*-Spezies ist in der Lage mit Tryptophan Pigmente zu bilden. CBS 6094, wahrscheinlich *M. sympodialis* (Mayser, Haze 1997; Mayser, Pickel 1997), kann keine Pigmente bilden. Er

zeigte im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Stämmen nach UV-Exposition keinen Wachstumsunterschied zwischen den auf Arginin- und Tryptophan-Medium gezüchteten Pilzen. Die einzelnen *M. furfur*-Stämme zeigten aber alle eine unterschiedlich stark ausgeprägte UV-Resistenz. Es fiel auf, daß 397, der Wildstamm, wie die anderen Stämme Pigmente bildete und damit einen UV-Schutz aufbauen konnte, aber die UV-Resistenz von allen untersuchten Pilzen am geringsten war. Es wäre denkbar, daß die unterschiedlich stark ausgeprägte UV-Resistenz auf die Ausprägung und den Krankheitsgrad der Pityriasis versicolor Einfluß hat.

Es wurde nachgewiesen, daß die untersuchten Pilzstämmen aus Tryptophan vor UV-Licht schützende Pigmente bilden. Dieser UV-Filter könnte eventuell auch den Menschen nutzen. An drei freiwilligen Probanden wurde gezeigt, daß der aus den pigmentbildenden Pilzen gewonnene Rohextrakt die ansonsten ungeschützte Haut vor UVB-Strahlen schützen kann. Die minimale Erythemdosis, die die Erythemschwelle unter UVB-Behandlung anzeigt, ließ sich erhöhen. Die UV-Filterwirkung liegt im Bereich 280-320 nm. Damit korreliert sie auch mit dem Absorptionsspektrum des Rohextraktes. Möglicherweise könnte der Rohextrakt zu einem wirksamen Bestandteil eines Sonnenschutzmittels werden. Dies ist allerdings noch nicht nachgewiesen und zum jetzigen Zeitpunkt nur ein Blick in die Zukunft.

6. Zusammenfassung

Mit den vorliegenden Untersuchungen sollte überprüft werden, ob Stämme der *M. furfur* spp. auf Tryptophan-haltigem Medium ein Pigment bilden, das sie wirksam vor UV-Exposition schützt.

Die zu untersuchenden Referenzstämme (CBS 7019, 1878, 6046, 4162, 6094 und ein Wildisolat 397 von *M. furfur*) wurden sechs Tage auf einer Variante des Dixon-Agar angezüchtet. Die Stickstoffquelle Pepton war durch Arginin bzw. Tryptophan ersetzt worden. Anschließend wurden die Hefezellen abgeerntet, in 0,9 % iger NaCl gewaschen, in einer Neubauer Zählkammer gezählt und auf 10^6 CFU / μ l eingestellt. Mit einer Eppendorfpipette wurden vier Aufimpfungen mit je 2 μ l (2×10^6) jeder Suspension auf Dixon - Agar (mit Pepton) vorgenommen. Zur Gewährung derselben Wachstumsbedingungen wurden die Hefezellen (mit ARG bzw. TRP angezüchtet) auf dieselbe Nährbodenplatte aufgetragen.

Unmittelbar danach wurden die Pilze mit UVA (100, 150 und 200 J cm^{-2} einmalige Dosis) bzw. UVB (100, 500, 1000, 1500, 2000 mJ cm^{-2} einmalige Dosis; 500, 1500, 2500 mJ cm^{-2} kumulativ) exponiert. Zum Vergleich wurden die Kontrollplatten nicht bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Agarplatten verschlossen und bei 32 °C inkubiert. Nach fünf Tagen wurden die Kolonien nach ihrem Aussehen und ihrer Konsistenz beurteilt und anschließend abgeerntet, in physiologischer NaCl gewaschen, zentrifugiert (4000 g / 5 min.) und 24 h bei 65°C in einem Trockengerät getrocknet. Das Wachstum wurde indirekt über die Biomasse durch Wiegen der vier Kolonien ermittelt. Die absolute Zellzahl wurde an einer Standarddeichkurve, die Gewicht und Zellzahl jedes Stammes und Aminosäure (Arginin und Tryptophan) enthielt, abgelesen.

Die Zellmorphologie der bestrahlten und nicht bestrahlten Pilze wurde mit einem Phasen-Kontrast-Mikroskop (Dialux, Leitz, Wetzlar, Germany) mit 1200-facher Vergrößerung beurteilt.

Aus pigmentbildenden Pilzen wurde ein Rohextrakt erstellt und auf die Haut von drei freiwilligen Probanden aufgetragen und mit der MED jedes einzelnen Probanden bestrahlt. Die Rötung der Haut wurde 24 h nach der UVB-Exposition beurteilt.

Unabhängig von der Stickstoffquelle wuchsen die nicht UV-Licht ausgesetzten Kontrollansätze nach fünf Tagen in identischer Größe. Die Kolonien waren von cremegelber Farbe und ließen sich aufgrund ihrer langsam härter werdenden Konsistenz gut abernten. Unter UVA- und UVB-Exposition traten Unterschiede in den Wachstumsraten auf. Bei den

auf Tryptophan angezüchteten Hefen war das Wachstum weniger stark eingeschränkt als bei denen auf Arginin-haltigem Medium. Die Unterschiede zwischen den beiden Wachstumsraten der jeweiligen Pilzstämmen waren besonders in den hohen UV-Bereichen signifikant ($p < 0,0001$). Die untersuchten UV-Bereiche sind an sonnigen Tagen in den Sommermonaten durchaus in Europa erreichbar.

Die einzelnen Referenzstämmen reagierten nicht alle gleich UV-lichtempfindlich. Der Wildstamm 397 wies die geringste UV-Resistenz auf. CBS 6094 zeigte keine Pigmentbildung und auch keine Unterschiede im Wachstumsverhalten unter UV-Licht.

Rein lichtmikroskopisch konnten keine Unterschiede in der Mikromorphologie der Zellen zwischen bestrahlten und unbestrahlten Kontrollen festgestellt werden. Große runde Zellen fanden sich eher auf Tryptophan-haltigem Medium und kleinere ovale Zellen auf Arginin.

Der aus CBS 7019 gewonnene Extrakt schützte die Haut der Probanden vor dem einfallenden UVB-Licht.

Diese Ergebnisse lassen folgende Schlußfolgerungen zu:

- Die untersuchten Referenzstämmen sind bis auf CBS 6094 in der Lage unter bestimmten nutritiven Voraussetzungen -d. h. die Zugabe von Tryptophan zum Medium- einen wirksamen UV-Filter aufzubauen.
- Die erhöhte UV-Resistenz zeigt sich sowohl bei einmaliger UVA- bzw. UVB- als auch bei mehrmaliger UVB-Exposition.
- Rein lichtmikroskopisch sind keine Unterschiede zwischen bestrahlten und nicht bestrahlten Mikroorganismen zu erkennen.
- Es handelt sich um einen chemischen Lichtfilter.
- Die Referenzstämmen reagieren nicht alle gleich stark auf das UV-Licht. Der Wildstamm 397 ist am lichtempfindlichsten.
- Durch die erhöhte UV-Resistenz sind die Pilze vor UV-Licht geschützt und haben dadurch einen Wachstumsvorteil, der auch bei der Pityriasis versicolor bedeutsam sein könnte.

Der aus pigmentbildendem Pilz gewonnene Rohextrakt schützt die menschliche Haut vor einfallendem UVB-Licht. Möglicherweise könnte aus dieser Substanz ein wirksames Sonnenschutzmittel entwickelt werden.

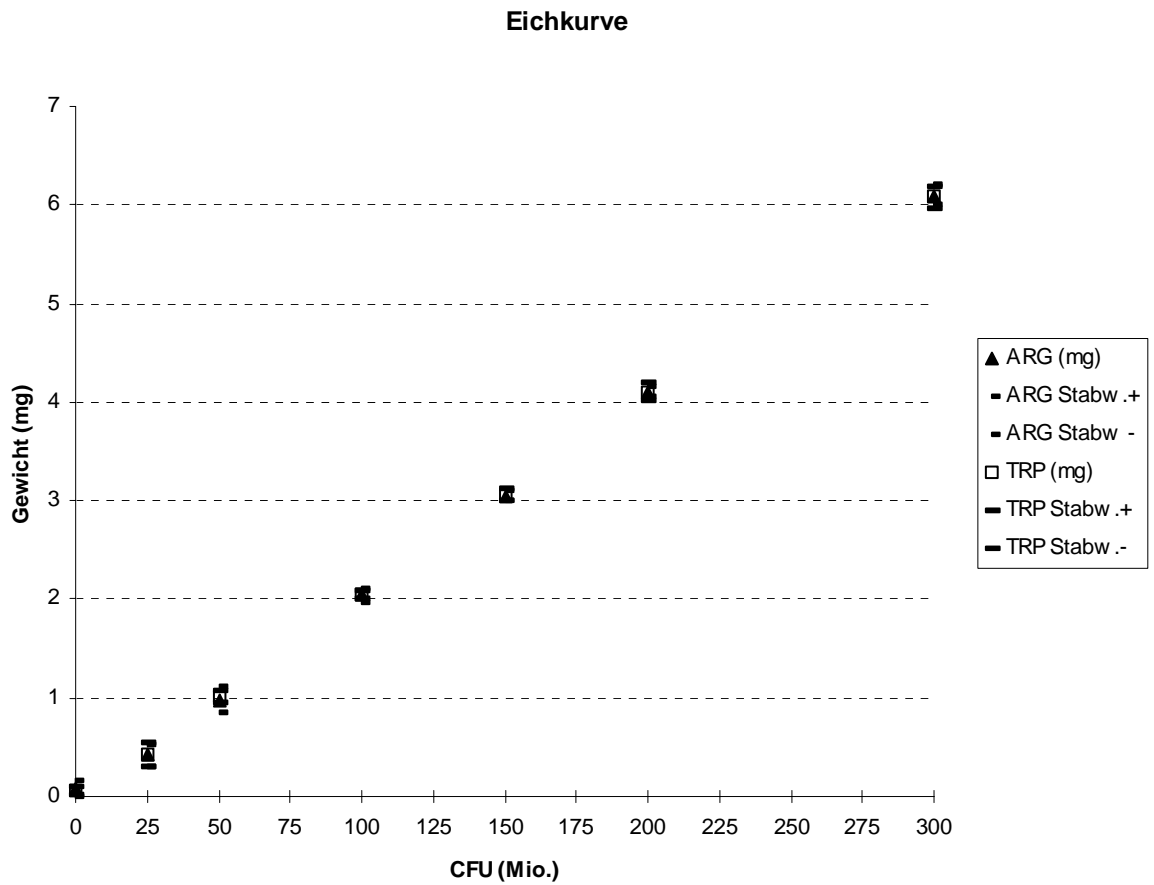
7. Anhang

Die Untersuchungsergebnisse der mit UV-Licht bestrahlten Pilze werden im folgenden in graphischer und tabellarischer Aufstellung aufgeführt. Die Meßwerte sind nach den *M.furfur*-Stämmen sortiert worden.

Unter 7.2. sind die Ergebnisse der UVA sowie UVB-Exposition (einmalig und kumulativ) nach Pilzstämmen geordnet tabellarisch dargestellt. Jede Tabelle besteht aus 12 Zeilen und 13 Spalten. In den Zeilen 1-8 werden nacheinander UV-Intensität, Gewicht der Pilze, Mittelwert und Standardabweichung in mg sowie die Signifikanz eingetragen. Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanz wurden mit einem Statistikprogramm errechnet. Die statistische Auswertung der Größenunterschiede zwischen mit Arginin und Tryptophan gefütterten Zellen bei unterschiedlicher UV-Exposition wurde mit einem parametrischen Test (students t test für unverbundene Stichproben) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf einen zweiseitigen p-Wert $<0,05$ gesetzt. Die sich anschließenden Zeilen enthalten Mittelwert und Standardabweichung in Millionen (CFU) umgerechnet. Anhand je einer Eichkurve, die bei jedem Versuch durchgeführt wurde, konnte von dem jeweiligen Gewicht (mg) auf die Zellzahl (Mio.) rückgeschlossen werden. Die Umrechnung des Gewichts der Standardabweichungen in die entsprechende Zellzahl wurde mit Dreisatz durchgeführt, wohingegen die Mittelwerte direkt aus der Eichkurve abgelesen wurden.

7.1. Eichkurve

Abbildung 29: Eichkurve (7019, 1878, 6046, 4162, 397 und 6094)



| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|--------|----------|-----|-------|-------|----|--|--|--|--|--|--|--|--|
| 100 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ARG | 3,01 | 2,98 | 3,09 | 3,05 | 3,08 | 2,95 | 3,12 | 3,03 | 3,0388 | 0,0577 | p=0,7392 | 150 | 152,8 | 147,2 | 95 | | | | | | | | |
| TRP | 3,08 | 3,01 | 3,05 | 2,99 | 3,0 | 2,92 | 3,10 | 3,08 | 3,0288 | 0,0601 | | 150 | 153 | 147 | 94 | | | | | | | | |
| 500 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ARG | 2,4 | 2,42 | 2,36 | 2,44 | 2,45 | 2,35 | 2,38 | 2,49 | 2,4113 | 0,0479 | p<0,0001 | 120 | 122,4 | 117,6 | 76 | | | | | | | | |
| TRP | 2,8 | 2,87 | 2,77 | 2,83 | 2,90 | 2,81 | 2,78 | 2,85 | 2,8263 | 0,0450 | | 139 | 141,2 | 136,8 | 87 | | | | | | | | |
| 1000 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ARG | 1,63 | 1,59 | 1,56 | 1,66 | 1,66 | 1,73 | 1,61 | 1,70 | 1,6425 | 0,0565 | p<0,0001 | 80 | 82,8 | 77,2 | 51 | | | | | | | | |
| TRP | 2,59 | 2,53 | 2,55 | 2,6 | 2,62 | 2,66 | 2,59 | 2,68 | 2,6025 | 0,0506 | | 130 | 132,5 | 127,5 | 82 | | | | | | | | |
| 1500 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ARG | 1,01 | 1,05 | 0,97 | 0,95 | 1,07 | 1,03 | 1,11 | 0,99 | 1,0225 | 0,0534 | p<0,0001 | 50 | 52,6 | 47,4 | 32 | | | | | | | | |
| TRP | 2,12 | 2,06 | 2,1 | 2,16 | 2,09 | 2,18 | 2,15 | 2,23 | 2,1361 | 0,0549 | | 105 | 107,7 | 102,3 | 66 | | | | | | | | |
| 2000 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ARG | 0,64 | 0,57 | 0,59 | 0,66 | 0,68 | 0,58 | 0,71 | 0,63 | 0,6325 | 0,0501 | p<0,0001 | 32 | 34,5 | 29,5 | 20 | | | | | | | | |
| TRP | 1,94 | 1,89 | 1,91 | 1,96 | 1,96 | 2,05 | 1,91 | 2,02 | 1,955 | 0,0558 | | 98 | 100,8 | 95,2 | 62 | | | | | | | | |
| 500 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|------|------|------|------|--------|---------|----------|-----|-------|-------|----|
| TRP | 1,41 | 1,47 | 1,39 | 1,43 | 1,425 | 0,03416 | | 71 | 72,7 | 69,3 | 41 |
| 2000 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | |
| ARG | 0,12 | 0 | 0 | 0 | 0,03 | 0,06000 | P<0,0001 | 0,8 | 2,4 | 0 | 0 |
| TRP | 1,21 | 1,05 | 1,18 | 1,23 | 1,1675 | 0,08098 | | 62 | 66,3 | 57,7 | 35 |
| 500 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | |
| ARG | 2,01 | 1,97 | 1,95 | 1,93 | 1,965 | 0,03416 | P<0,0001 | 98 | 99,7 | 96,3 | 56 |
| TRP | 2,42 | 2,45 | 2,35 | 2,37 | 2,3975 | 0,04573 | | 121 | 123,3 | 118,7 | 69 |
| 1500 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | |
| ARG | 0,63 | 0,65 | 0,57 | 0,59 | 0,61 | 0,03651 | P<0,0001 | 31 | 32,9 | 29,1 | 18 |
| TRP | 1,04 | 1,09 | 0,99 | 0,97 | 1,0225 | 0,05377 | | 52 | 54,7 | 49,3 | 30 |
| 2500 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | |
| ARG | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | n.b. | 0 | 0 | 0 | 0 |
| TRP | 0,84 | 0,78 | 0,88 | 0,75 | 0,8125 | 0,05852 | | 41 | 44 | 38 | 23 |

n.b.: nicht berechenbar

6046

| | | | | | | | | | | | |
|--------------------|----|----|----|----|---------|--------|-------------|-----------|------------|------------|---|
| UV - Intensität | mg | mg | mg | mg | MW (mg) | S (mg) | Signifikanz | MW (Mio.) | + S (Mio.) | - S (Mio.) | % |
| Keine Bestrah- | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|------|------|------|------|--------|---------|----------|-----|-------|-------|----|
| TRP | 2,21 | 2,15 | 2,28 | 2,25 | 2,2225 | 0,05620 | | 110 | 112,8 | 107,2 | 74 |
| 1500 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | |
| ARG | 0,75 | 0,81 | 0,83 | 0,77 | 0,79 | 0,03651 | P<0,0001 | 39 | 40,8 | 37,2 | 27 |
| TRP | 1,78 | 1,82 | 1,76 | 1,72 | 1,77 | 0,04163 | | 88 | 90,1 | 86 | 59 |
| 2000 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | |
| ARG | 0,62 | 0,58 | 0,67 | 0 | 0,4675 | 0,3138 | P=0,0034 | 16 | 26,7 | 5,3 | 11 |
| TRP | 1,2 | 1,14 | 1,24 | 1,28 | 1,215 | 0,05972 | | 62 | 65 | 59 | 42 |
| 500 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | |
| ARG | 1,2 | 1,17 | 1,25 | 1,21 | 1,2075 | 0,03304 | P<0,0001 | 61 | 62,7 | 59,3 | 41 |
| TRP | 2,55 | 2,6 | 2,52 | 2,28 | 2,4875 | 0,1422 | | 128 | 135,3 | 120,7 | 86 |
| 1500 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | |
| ARG | 0,85 | 0,82 | 0,35 | 0,88 | 0,725 | 0,2512 | P=0,0004 | 34 | 45,8 | 22,2 | 23 |
| TRP | 1,6 | 1,58 | 1,63 | 1,66 | 1,6175 | 0,03500 | | 80 | 81,7 | 78,3 | 54 |
| 2500 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | |
| ARG | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | n.b. | 0 | 0 | 0 | 0 |
| TRP | 1,2 | 1,17 | 1,23 | 1,25 | 1,2125 | 0,03500 | | 61 | 62,8 | 59,2 | 41 |

| UV - Intensität | mg | mg | mg | mg | mg | MW (mg) | S (mg) | Signifikanz | MW (Mio.) | + S (Mio.) | - S (Mio.) | % |
|----------------------------|------|------|------|------|------|---------|---------|-------------|-----------|------------|------------|-----|
| Keine Bestrahlung | | | | | | | | | | | | |
| ARG | 2,91 | 2,98 | 2,98 | 2,98 | 3,02 | 2,9725 | 0,04573 | P=0,9442 | 150 | 152,3 | 147,7 | 100 |
| TRP | 3,04 | 2,97 | 2,97 | 2,92 | 2,95 | 2,97 | 0,05099 | | 152 | 154,6 | 149,4 | 100 |
| 100 J/cm ² UVA | | | | | | | | | | | | |
| ARG | 3,03 | 2,98 | 2,98 | 3,05 | 2,96 | 3,005 | 0,04203 | P=0,3556 | 150 | 152,1 | 148 | 100 |
| TRP | 3 | 2,14 | 2,14 | 3,04 | 2,97 | 2,7875 | 0,4326 | | 149 | 172,1 | 125,9 | 98 |
| 150 J/cm ² UVA | | | | | | | | | | | | |
| ARG | 2,56 | 2,62 | 2,62 | 2,66 | 2,64 | 2,62 | 0,04320 | P=0,0010 | 133 | 135,2 | 130,8 | 89 |
| TRP | 2,81 | 2,74 | 2,74 | 2,77 | 2,79 | 2,7775 | 0,02986 | | 142 | 143,5 | 140,5 | 93 |
| 200 J/cm ² UVA | | | | | | | | | | | | |
| ARG | 0,54 | 0,48 | 0,48 | 0,47 | 0,51 | 0,5 | 0,03162 | P<0,0001 | 22 | 23,4 | 20,6 | 15 |
| TRP | 0,99 | 1,02 | 1,02 | 1,05 | 0,97 | 1,0075 | 0,03500 | | 52 | 53,8 | 50,2 | 34 |
| 100 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | | |
| ARG | 3,01 | 3,08 | 3,08 | 2,97 | 2,99 | 3,0125 | 0,04787 | P=0,6637 | 148 | 150,4 | 145,6 | 99 |
| TRP | 3,02 | 3,04 | 3,04 | 2,99 | 3,05 | 3,025 | 0,02646 | | 148 | 149,5 | 146,7 | 97 |
| 500 mJ/cm ² | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | |
|-----|------|------|------|------|--------|---------|--|----|----|----|----|
| TRP | 0,85 | 0,82 | 0,79 | 0,89 | 0,8375 | 0,04272 | | 39 | 41 | 37 | 26 |
|-----|------|------|------|------|--------|---------|--|----|----|----|----|

397

| UV - Intensität | mg | mg | mg | mg | MW (mg) | S (mg) | Signifikanz | MW (Mio.) | + S (Mio.) | - S (Mio.) | % |
|----------------------------|------|------|-------|------|---------|---------|-------------|-----------|------------|------------|-----|
| Keine Bestrahlung | | | | | | | | | | | |
| ARG | 2,91 | 2,95 | 2,97 | 2,9 | 2,9325 | 0,03304 | p=0,6720 | 142 | 143,6 | 140,4 | 100 |
| TRP | 2,89 | 2,93 | 2,98 | 2,88 | 2,92 | 0,04546 | | 143 | 145,2 | 140,8 | 100 |
| 100 J/cm ² UVA | | | | | | | | | | | |
| ARG | 2,1 | 2,08 | 2,11 | 2,07 | 2,09 | 0,01826 | p=0,6452 | 105 | 106 | 104,1 | 74 |
| TRP | 2,11 | 2,05 | 2,09 | 2,08 | 2,0825 | 0,02500 | | 105 | 106,3 | 103,7 | 73 |
| 150 J/cm ² UVA | | | | | | | | | | | |
| ARG | 1,77 | 1,82 | 1,795 | 1,75 | 1,78375 | 0,03038 | p=0,0042 | 87 | 88,5 | 85,5 | 61 |
| TRP | 1,87 | 1,91 | 1,85 | 1,93 | 1,89 | 0,03651 | | 92 | 93,8 | 90,2 | 64 |
| 200 J/cm ² UVA | | | | | | | | | | | |
| ARG | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | n.b. | 0 | 0 | 0 | 0 |
| TRP | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 100 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | |

78

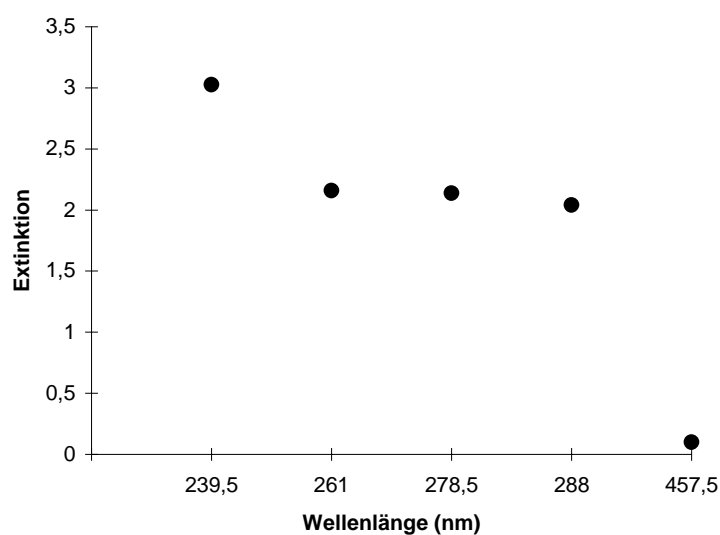
| | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|------|------|------|------|---------|---------|----------|-----|-------|-------|----|
| ARG | 2,41 | 2,38 | 2,35 | 2,32 | 2,365 | 0,03873 | p=0,0432 | 120 | 122 | 118 | 85 |
| TRP | 2,45 | 2,44 | 2,38 | 2,46 | 2,4325 | 0,03594 | | 121 | 122,8 | 119,2 | 85 |
| 500 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | |
| ARG | 1,57 | 1,63 | 1,53 | 1,59 | 1,58 | 0,04163 | p<0,0001 | 77 | 79 | 75 | 54 |
| TRP | 1,99 | 2,06 | 1,97 | 2,02 | 2,01 | 0,03916 | | 98 | 100 | 96,1 | 69 |
| 1000 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | |
| ARG | 0,81 | 0,78 | 0,75 | 0 | 0,585 | 0,3908 | p=0,0029 | 29 | 48,4 | 9,6 | 20 |
| TRP | 1,55 | 1,49 | 1,58 | 1,52 | 1,535 | 0,03873 | | 78 | 80 | 76 | 55 |
| 1500 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | |
| ARG | 0,31 | 0 | 0,27 | 0,37 | 0,2375 | 0,1636 | p<0,0001 | 8 | 13,5 | 2,5 | 6 |
| TRP | 1,07 | 1,13 | 1,01 | 1,09 | 1,07475 | 0,04990 | | 52 | 54,4 | 49,6 | 36 |
| 2000 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | |
| ARG | 0,15 | 0,29 | 0 | 0 | 0,11 | 0,1393 | p=0,0005 | 4 | 9,1 | 1,1 | 3 |
| TRP | 0,61 | 0,65 | 0,58 | 0,55 | 0,5975 | 0,04272 | | 30 | 32,1 | 27,9 | 21 |
| 500 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | |
| ARG | 2,65 | 2,62 | 2,69 | 2,49 | 2,6125 | 0,08655 | p=0,8394 | 130 | 134,3 | 125,7 | 92 |
| TRP | 2,65 | 2,48 | 2,64 | 2,63 | 2,6 | 0,08042 | | 130 | 134 | 126 | 91 |
| 1500 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | |
| ARG | 0,61 | 0,59 | 0,65 | 0,55 | 0,6 | 0,04163 | p=0,0006 | 30 | 32,1 | 27,9 | 21 |
| TRP | 1,03 | 1,05 | 0,82 | 1,02 | 0,98 | 0,1074 | | 51 | 56,6 | 45,4 | 36 |

| | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|------|------|------|------|--------|---------|----------|-----|-------|-------|----|
| TRP | 1,16 | 1,19 | 1,38 | 1,22 | 1,2375 | 0,0981 | | 58 | 62,6 | 53,4 | 41 |
| 100 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | |
| ARG | 2,41 | 2,38 | 2,46 | 2,44 | 2,4225 | 0,03500 | p=0,6027 | 123 | 124,8 | 121,2 | 86 |
| TRP | 2,44 | 2,38 | 2,45 | 2,48 | 2,4375 | 0,04193 | | 123 | 125,1 | 120,9 | 86 |
| 500 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | |
| ARG | 1,51 | 1,47 | 1,42 | 1,41 | 1,4525 | 0,0465 | p=0,1786 | 72 | 74,3 | 69,7 | 50 |
| TRP | 1,51 | 1,55 | 1,49 | 1,45 | 1,5 | 0,0416 | | 74 | 76,1 | 72 | 52 |
| 1000 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | |
| ARG | 0,82 | 0,78 | 0,71 | 0,75 | 0,765 | 0,04655 | p=0,4141 | 40 | 42,4 | 37,6 | 28 |
| TRP | 0,88 | 0,82 | 0,77 | 0,73 | 0,8 | 0,06481 | | 39 | 42,2 | 35,8 | 27 |
| 1500 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | |
| ARG | 0,51 | 0,42 | 0,45 | 0,41 | 0,4475 | 0,04500 | p=0,4128 | 19 | 20,9 | 17,1 | 13 |
| TRP | 0,53 | 0,51 | 0,42 | 0,45 | 0,4775 | 0,05123 | | 25 | 27,7 | 22,3 | 17 |
| 2000 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | |
| ARG | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | n.b. | 0 | 0 | 0 | 0 |
| TRP | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 500 mJ/cm ² UVB | | | | | | | | | | | |
| ARG | 2,02 | 1,98 | 2,08 | 1,95 | 2,0075 | 0,05620 | p=0,3801 | 100 | 102,8 | 97,2 | 70 |
| TRP | 2,05 | 1,96 | 1,74 | 2 | 1,9375 | 0,1367 | | 100 | 107,1 | 92,9 | 70 |
| 1500 mJ/cm ² | | | | | | | | | | | |

7.3. UV - Spektren des Rohextraktes

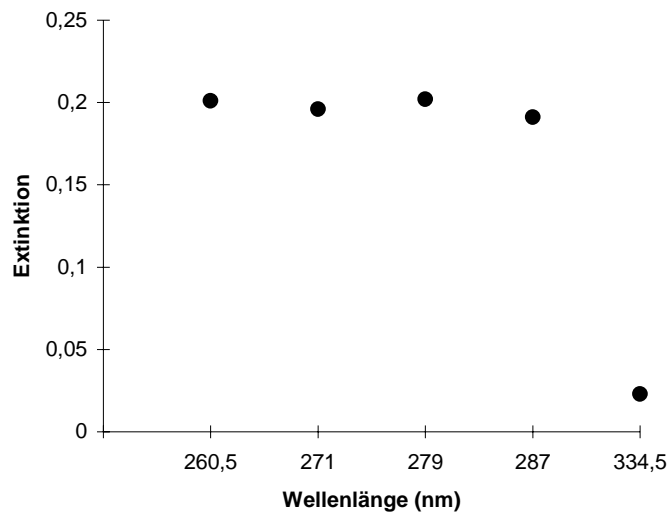
Die folgenden Abbildungen stellen die Ergebnisse des 1:100 und 1:1000 mit Ethanol verdünnten Rohextraktes dar. Auf der x - Achse sind die Wellenlänge (nm) und auf der y - Achse die entsprechenden Absorptionswerte des Extraktes bei der jeweiligen Verdünnungsstufe eingetragen. An die Graphik schließt sich jeweils eine zweisepaltige Wertetabelle an.

Verdünnung 1:100 mit Ethanol



| Wellenlänge | Extinktion |
|-------------|------------|
| 239,5 | 3,027 |
| 261 | 2,159 |
| 278,5 | 2,137 |
| 288 | 2,040 |
| 457,5 | 0,099 |

Verdünnung 1:1000 mit Ethanol



| Wellenlänge | Extinktion |
|-------------|------------|
| 260,5 | 0,201 |
| 271 | 0,196 |
| 279 | 0,202 |
| 287 | 0,191 |
| 334,5 | 0,023 |

7.4. Eichkurven - Meßergebnisse aus 7019, 1878, 6046, 4162, 397, und 6094

| Zellzahl (Mio.) | Pilz | Arg | TRP | Zellzahl (Mio.) | ARG | TRP | Zellzahl (Mio.) | ARG | TRP |
|-----------------|-------------|-------|-------|-----------------|------|------|-----------------|------|------|
| 0 | 7019 | 0,02 | 0,04 | 25 | 0,18 | 0,25 | 50 | 0,92 | 1,11 |
| | | 0,06 | 0,07 | | 0,2 | 0,3 | | 0,99 | 1,1 |
| | | 0,08 | 0,09 | | 0,28 | 0,2 | | 1,05 | 1,12 |
| | | 0,04 | 0,02 | | 0,32 | 0,22 | | 1,03 | 0,99 |
| | 1878 | 0,05 | 0,07 | | 0,4 | 0,47 | | 1,01 | 1,03 |
| | | 0,02 | 0,09 | | 0,49 | 0,5 | | 0,98 | 0,96 |
| | | 0,09 | 0,12 | | | | | | |
| | | 0,13 | 0,05 | | | | | | |
| | 6046 | 0,02 | 0,03 | | 0,45 | 0,48 | | 0,96 | 1,02 |
| | | 0,018 | 0,027 | | 0,55 | 0,56 | | 0,99 | 0,95 |
| | | 0,022 | 0,033 | | | | | | |
| | | 0,027 | 0,03 | | | | | | |
| | 4162 | 0,12 | 0,02 | | 0,41 | 0,38 | | 1,01 | 0,91 |
| | | 0,08 | 0,09 | | 0,49 | 0,42 | | 0,98 | 0,95 |
| | | 0,04 | 0,1 | | 0,52 | 0,49 | | 1,05 | 1,05 |
| | | 0,01 | 0,15 | | 0,42 | 0,5 | | 1,08 | 1,01 |
| | 397 | 0,03 | 0,05 | | 0,51 | 0,53 | | 1,03 | 1,05 |
| | | 0,07 | 0,06 | | 0,49 | 0,55 | | 0,99 | 1,02 |
| | | 0,1 | 0,02 | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | |
|----------|------|-------------|------------|--|--|------------|--|------------|--|--|------------|--|------------|
| | | 0,01 | 0,1 | | | | | | | | | | |
| | 6094 | 0,12 | 0,02 | | | 0,47 | | 0,54 | | | 1,03 | | 1,04 |
| | | 0,13 | 0,06 | | | 0,52 | | 0,48 | | | 0,51 | | 1,02 |
| | | 0,04 | 0,08 | | | | | | | | | | |
| | | 0,5 | 0,13 | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | |
| MW | | 0,076125 | 0,06458333 | | | 0,41875 | | 0,429375 | | | 0,975625 | | 1,020625 |
| Stabw. | | 0,09869951 | 0,03800105 | | | 0,11523165 | | 0,12173571 | | | 0,13012654 | | 0,05960635 |
| Stabw. + | | 0,17482451 | 0,10258438 | | | 0,53398165 | | 0,55111071 | | | 1,10575154 | | 1,08023135 |
| Stabw. - | | -0,02257451 | 0,02658228 | | | 0,30351835 | | 0,30763929 | | | 0,84549846 | | 0,96101865 |

| Zellzahl (Mio.) | ARG | TRP | Zellzahl (Mio.) | ARG | TRP | Zellzahl (Mio.) | ARG | TRP | ARG | TRP |
|--------------------|------|------|--------------------|------|------|--------------------|------|------|-----|-----|
| 100 | 2,12 | 1,99 | 150 | 3,11 | 3,15 | 200 | 4,1 | 4,2 | | |
| | 2 | 2,05 | | 3,03 | 3,08 | | 4,08 | 3,99 | | |
| | 2,19 | 2,08 | | 3,15 | 3,11 | | 4,15 | 4,18 | | |
| | 2,18 | 2,1 | | 3,08 | 3,09 | | 4,03 | 4,22 | | |
| | 2,02 | 2,01 | | 3,08 | 2,97 | | 4,13 | 4,05 | | |
| | 1,97 | 2,05 | | 3,02 | 2,99 | | 4,08 | 4,11 | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | 1,96 | 2,08 | | 3,08 | 3,1 | | 4,1 | 4,02 | | |
| | 2,06 | 2,02 | | 2,99 | 3,05 | | 4,12 | 4,11 | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | 1,99 | 2,02 | | 3,07 | 3,1 | | 4,05 | 4,03 | | |

| | | | | | | | | |
|-------------------|------------|------------|--|-----------|------------|--|------------|------------|
| | 2,06 | 2,13 | | 2,97 | 3,05 | | 4,15 | 4,15 |
| | 2,1 | 2,08 | | 3,1 | 3,15 | | 4,2 | 4,08 |
| | 2,03 | 2,01 | | 3,01 | 3,02 | | 4,15 | 4,1 |
| | 1,97 | 2,05 | | 3,02 | 3,05 | | 4,05 | 4,03 |
| | 1,95 | 2,02 | | 2,98 | 3,02 | | 4 | 3,99 |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | 2,03 | 2,01 | | 3,09 | 3,04 | | 4,12 | 4,07 |
| | 1,98 | 2,05 | | 3,07 | 3,06 | | 4,15 | 4,3 |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| Mittelwert | 2,038125 | 2,046875 | | 3,053125 | 3,064375 | | 4,10375 | 4,101875 |
| Stabw. | 0,07547351 | 0,03876747 | | 0,0514741 | 0,05150647 | | 0,05302515 | 0,08856024 |
| + Stabw. | 2,11359851 | 2,08564247 | | 3,1045991 | 3,11588147 | | 4,15677515 | 4,19043524 |
| - Stabw. | 1,96265149 | 2,00810753 | | 3,0016509 | 3,01286853 | | 4,05072485 | 4,01331476 |

| Zellzahl (Mio.) | ARG | TRP |
|--------------------|------|------|
| 300 | 6,22 | 6,3 |
| | 6,19 | 6,25 |
| | 6,29 | 6,2 |
| | 6,33 | 6,18 |
| | 6,04 | 6,05 |
| | 5,97 | 5,94 |

| | | | |
|-------------------|----------------|----------------|--|
| | | | |
| | | | |
| | 5,99 | 5,91 | |
| | 6,03 | 6,01 | |
| | | | |
| | | | |
| | 6,09 | 6,02 | |
| | 6,15 | 6,09 | |
| | 5,99 | 6,12 | |
| | 6,1 | 6,15 | |
| | 5,99 | 6,03 | |
| | 6,02 | 6,05 | |
| | | | |
| | | | |
| | 5,97 | 5,99 | |
| | 6,02 | 6,05 | |
| | | | |
| | | | |
| Mittelwert | 6,08687 5 | 6,08375 | |
| Stabw. | 0,11625 941 | 0,1090489 2 | |
| + Stabw. | 6,20313 441 | 6,1927989 2 | |
| - Stabw. | 5,97061 559 | 5,9747010 8 | |

7.5. Verwendete Geräte und Materialien

1.) Zentrifuge:

Firma: Hettich Rotanta / RP

Rotor: 154 mm Radius

2.) Reagenzglasschüttler: Vortex Genie 2TM

Firma: Bender & Hobein AG ; Zürich/Schweiz; Manufactured By Scientific Industries INC., Bohemia, N.Y. 11716 USA

Model: G - 560 E, Serno: 2 - 33194, Voltage: 220, AMPS: 0,5, Hz: 50

3.) Lichtmikroskop: Dialux

Firma: Ernst Leitz, Wetzlar

Service: Leica

40 er Objektiv

4.) Brutschrank:

Firma: Heraeus Holding GMBH

Bedingungen: 30°C; 1%CO₂

5.) Lamina / Sicherheitsarbeitsbank / Schwebstoff - Filter: Uniflow Biohazard Laminar Flow

Firma: Biohazard

Typ: Uniflow UUUB 1200; Seriennummer: 89 / 23002

Luftmenge (m³ / h):1250; Anfangswiderstand: 125; Abscheidungsgrad: 99;

Durchlassungsgrad:0,3y; Watt: 450; Volt: 220; Hz: 50

6.) Autoklav:

Firma: Melag Autoklav 23 (131°C 1 bar)

7.) Waage: Mettler Toledo

Firma: Mettler; Made in Switzerland; SNR 1113453350; TDNR 26523131; PB 602

Volt: 8 - 14,5; Hz: 50 / 60 ; Höchstlast:610 g, Mindestlast: 0,5 g, Eichwert (e):0,1 g,

Ablesbarkeit (d):10 g

8.) Oberflächentemperaturheizplatte (zum Agarkochen): Ikamag RCT

Firma: Janke und Kunkel GMBH & CoKG, IKA - Labortechnik, D 7813 Staufen i Br.,

Telefon: 07633 / 831 - 0

Fabrikatnummer: 690779; Typ: RCT; 220 Volt, 50 / 60 Hz; Heizung: 600 Watt; Motor: 30W; Gesamtleistung: 630 W

9.) Trockengerät: Thermo Dux Techne DRI - Block DB 3

Firma: Made in England by Techne (Cambridge) LTD Duxford Cambridge U.K.; Techne Gesellschaft für Laborgeräte mbH, Postfach 1622, D - 97866 Wertheim, Telefon: 09342 / 880188

Model: FD B 030D; Serial No: 54530 - 10; Ampere: 2,8, Volt: 230, Watt: 650, Hz: 50 / 60
Temperaturen: 0 - 105°C

10.) Dosimeter: Waldmann UV - Meter

Firma: H. Waldmann GMBH & Co, Werk für Lichttechnik

Typ: 585 100, Ser.Nr.: 2668

Meßbereich und Toleranz:

UVA: bis 199,9 mW / cm² +/-5%

UVB: bis 19,99 mW / cm² +/- 5%

Stromversorgung durch Batterie 9Volt, IEC 6LR61 (Alkali - Mangan Batterie)

11.) Spektralphotometer:

DU₆₈-Spektralphotometer von Beckmann; Memory PacTM Module

12.) Analysenwaage (Andrologie):

Firma: Sartorius research; Typ: R 180 D - "D₁

Einstellungsmöglichkeiten: 1: Max: 33g; Min: 50mg, T: -33g, d_d: 0,01mg, e=1mg

2: 182 50 -182 0,1 1

Sartorius GMGH Göttingen, 5K innerhalb 291 K./298K, (5K innerhalb +18°C / +25°C)

220 Volt, 50 Hz, 12 Va

geeicht bis 1998

Korrektur der Anzeige: Die Anzeige zeigt den Wägewert des Wägegutes an. Die Masse des Wägegutes kann mit obiger Formel errechnet werden.

13.) Lichtschutzsalbe: asab UV

Faktor 22 ; Chemische Fabrik Kreussler Pharma & Co GMBH

14.) Reagenzgläser:

Firma: Assistant; Durchmesser: 75 x 12 mm; Nr: 2775 / 6; starkwandig

15.) Pasteurpipetten: Pasteur Capillary Pipettes

Firma: Mainz WU; mit lang ausgezogener feiner Spitze, Kapillarinnendurchmesser 1,0 mm; Saugrohr: ca 25 mm; Rohraußendurchmesser: 7 mm; aus Glas; insgesamt 150 mm; Art - Nr: 197734145

16.) Erlenmeyerkolben:

500 ml und kleinere

Firma: Schott

17.) Parafilm M:

American National CAN T_m; Greenwich, CT. 06836; Art - Nr: 280131012

18.) Mörser: aus Porzellan, innen rauh, außen glasiert, DIN: 12906

Pastille: Stiel glasiert, Reibfläche rauh, DIN: 12906

19.) UV - Augenschutzbrille:

UV - Absorption 99,5%, Schutz vor UV - Strahlen im kurzwelligen Bereich, dunkle Gläser, Art - Nr: 360125059

20.) 0,9% NaCl:

Firma: b.Braun Melsungen AG, D - 34209 Melsungen, CH.B.: 7053 A 95

199ml Injektionslösung enthalten: Natriumchlorid 0,9g in Wasser für Injektionszwecke, Elektrolyte: mmol / l Natrium: 154 und Chlorid: 154

21.) Eppendorfpipetten 4710 14696 N:

22.) Pipettenspitzen:

weiß: 0,5 - 10 µl; Art - Nr:9260.1

gelb: 1 - 200 µl 2395.1

blau: 100 - 1000 µl 2679.1

22.) Petrischalen:

Firma: Nunc Brand Products

5 bzw. 10 cm Durchmesser

23.) aqua ad iniectabilia Hameln:

Firma: Pharma Hameln Infusionen GMBH, 31789 Hameln

100 ml zur Bereitung parenteraler Lösungen

24.) Agar:

Merck KGaA, Darmstadt; CHg.-Nr: K 23452615 645

25.) pH - Indikatorstäbchen: Neutralit pH 5 - 10

Merck

26.) Aminosäuren: Sigma Chemical Co. St. Louis USA

L - Valin: (L - 2 - Amino - 3 - methylbutanoic acid) [72-18-4] C₅H₁₁NO₂ FW 117.1

V - 0258 LOT 25 H02932

L - Phenylalanin: (L - 2 - Amino - 3 - phenylpropanoic acid) [63-91-2] C₉H₁₁NO₂ FW 165.2

P - 2126 LOT 25 H0830

L - Alanin: [56-41-7] C₃H₇NO₂ FW 89.09

A - 5824 LOT 84 H02461

Glycin: (Aminoacetic acid) [56-40-6] C₂H₅NO₂ FW 75.07

G - 7126 LOT 85 H0780

L - Leucin: (L - 2 - Amino - 4 - methylpentanoic acid) [61-90-5] C₆H₁₃NO₂ FW 131.2

L - 5652 LOT 95 H00211

L - Isoleucin: [73-32-5] $C_6H_{13}NO_2$ FW 131.2

I - 2752 LOT 36 H0240

L - Prolin: [147-85-3] $C_5H_9NO_2$ FW 115.1

P - 8449 LOT 25 H08281

L - Tryptophan: [73-22-3] $C_{11}H_{12}N_2O_2$ FW 204.2 LOT 113 H02901

Arginin: [1119-34-2] $C_6H_{14}N_4O_2$ FW 210.7 LOT 74 H02802

27.) Dixon - Agar:

3,6% Malzextrakt: Malzextrakt - Bouillon, Merck, Nr.5397

0,6% Pepton: Pepton aus Casein, Fa. Merck, Nr.2239

2,0% Ochsengalle: Ox - Bile, desiccated, Fa. Oxoid L50

1,0% Tween 40: Tween40 Atlas, Fa. Caelo, Nr.3474

0,4% Olivenöl: aus der Apotheke sterilisiert

1,2% Agar: Agar Agar reinst, Fa. Merck Nr.1615

Cycloheximid: Acitidion 98% und Cycloheximid 98%, Aldrich, CAT.Nr.: C10,445-0

28.) CBS - Referenzstämme:

Folgende Referenzstämme stehen kryokonserviert zur Verfügung:

Malassezia-Referenzstämme:

| Stammbezeichnung | Stamm |
|------------------|------------------|
| CBS 1878 T | <i>M. furfur</i> |
| CBS 7019 NT | <i>M. furfur</i> |
| CBS 6046 | <i>M. furfur</i> |
| CBS 6094 | <i>M. furfur</i> |
| CBS 4162 | <i>M. furfur</i> |

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands

T: type-strain, NT: Neo-type strain

Wildstamm aus der Hautklinik:

| Probennummer | Herkunft | Institut / Herkunft |
|--------------|--------------|---------------------|
| 03 / 97 | Hautschuppen | Gießen |

29.) Bestrahlungsgeräte:

UV /Puva 800: Waldmann Lichttechnik, Schwenningen, Germany

Sellamed 4000: Sellas Sunlight, Gevelsberg, Germany

Strahler: Philips TL 20 W / 12

8. Literaturverzeichnis

Ackerman, A. B.: Histologic diagnosis of inflammatory skin disease. 2 nd edn., Baltimore: Williams and Wilkins, pp. 757-8, 1997

Acton, H. W., Panja, J.: Seborrheic dermatitis or pityriasis capitis: A lesion caused by *Malassezia ovale* (Indian. Med. Gaz. 62: 603-614, 1927)

Adamson, H. G.: Pityriasis versicolor with subsequent leukodermic patches. (Brit. J. Derm. 61: 322-322, 1949)

Allen, H. B., Charles, C. R., Johnson, B. L.: Hyperpigmented tinea versicolor (Arch. Dermatol. 112: 1110-1112, 1972)

Aste, N., Pau, M., Pina, A.L. Colombo M. D., Biggo, P.: Clinical efficacy and tolerability of terbinafine in patients with pityriasis versicolor (Mycoses 34: 353-357, 1991)

Baillon, E. H.: Traite´ de botanique medicale cryptogamique (Doin Paris 1889)

Balus, L., Grigoriu, D.: Pityriasis versicolor In: Mykologie Nr:4. Cilag GMBH, (1982)

Barnes, W.G., Sauer, G.C., Arnold, J.D.: Scanning electron microscopy of tinea versicolor organism (*Malassezia furfur* = *Pityrosporum orbiculare*?) Arch. Derm. 107: 392-394. 1973

Bateman, T.: Abbildungen der Hautkrankheiten, darstellend die charakteristischen Erscheinungen ihrer Hauptgattungen und Arten nach Willans Classification. Erste Lieferung, Verlag des Großh. Sächs. Priv. Landes - Industrie - Comptoirs, Weimar, 1829

Bélec, L., Testa, J., Bouree, P.: Pityriasis versicolor in the Central African Republic: a randomized study of 144 cases. J. Med. Vet. Mycol. 29: 323-329, 1991

Benham, R. W.: The cultural characteristics of *Pityrosporum ovale* - a lipophilic fungus (J. Invest. Dermatol. 2: 187 - 203, 1939)

Blumenthal, H.: Tinea versicolor of the penis. (Arch. Derm. 103. 461-462, 1971)

Bojanovsky, A., Bohnert, E., Jung, E.G.: *Pityrosporum orbiculare*: Erreger verschiedener klinischer Bilder und Modell einer Depigmentierungsart. Akt. Derm. 5: 19-25, 1979

Borelli, D., Jacobs, P. H., Nall, L.: Tinea versicolor: epidemiological, clinical and therapeutic aspects (J. Am. Acad. Dermatol. 25: 300 - 305, 1991)

Braun-Falco, O., Plewig, G., Wolff, H. H.: Kapitel 7: Dermatomykosen (Eichstedt) S.279 - 318, Kapitel 13 Physikalisch und Chemisch bedingte Hauterkrankungen, S.493-503; Kapitel 68 Äußerliche Dermatotherapie, S.1515-1516; Kapitel 70 Physikalische Therapie, S.1556-1566. In: Braun-Falco, O.; Plewig, G., Wolff, H. H.; (Hrsg.): Dermatologie und Venerologie 2. Auflage. Springer-Verlag, (1997)

Breathnach, A. S., Nazzaro - Porro, M., Passi, S.: Azelaic acid (Br. J. Dermatol. 111: 115 - 120, 1984)

Brotherton, J.: Lack of swelling and shrinking of *Pityrosporum ovale* in media of different osmotic pressures and its relationship with survival in the relatively dry condition of the scalp (J. Gen. Microbiol. 48: 305-308, 1967)

Burg, G., Hartmann, A. A., Konz, B.: Neuere Erkenntnisse über die Rolle der DNA-Reparatur in der Entstehung von Hautkarzinomen (Rünger, T. M.). In: Burg,G.; Hartmann,A. A.; Konz, B.; (Hrsg.): Onkologische Dermatologie. Neue Aspekte Altersbedingte Besonderheiten. Band 7. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York(1992),S. 15-22

Burke, R. C.: Tinea versicolor: susceptibility factors and experimental infections in human beings (J. Invest. Dermatol. 36: 389 - 401, 1961)

Canizares, O., Shatin, H., Kellert, A.J.: Cushing's syndrome and dermatomycosis. Arch. Der. 80: 705-709, 1959

Cannon, P. F.: International Commission on the taxonomy of fungi (ICTF): name changes in fungi of microbiological, industrial and medical importance, Part 2 (Microbiological Sciences 3: 285 - 287, 1986)

Caprilli, F., Mercantini, R., Nazarro Porro, M., Passi, S., Tonolo, A.: Studies of the genus *Pityrosporum* in submerged culture. Mycopath. Mycol. Appl. 51: 171-189, 1973

Castellan, A., Chalmers, A.: Manual of tropical medicine, 2 nd edn., Baillière Tindall & Cox, London, 1913

Chang, J. C. H., Ossoff, S. F., Lobe, D. C., Dorfmann, M. H., Dumais, C. M., Qualls, R. G., Johnson, J. D.: UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms (Appl. Environ. Microbiol. 49: 1361-1365, 1985)

Charles, C.R., Sire, D.J., Johnson, B.L., Beidler, J.G.: Hypopigmentation in tinea versicolor: A histochemical and electronmicroscopic study. Int. J. Derm. 12, 48-58, 1973

Dorn, M., Roehnert, K.: Dimorphism of *Pityrosporum orbiculare* in a defined culture medium (J. Invest. Dermatol. 69: 224 - 248, 1977)

Dotz, W. I.: Tinea versicolor: a light and electron microscopic study of hyperpigmented skin (J. Am. Acad. Dermatol. 12: 37 - 44, 1985)

Eichstedt, C. F.: Pilzbildung in der Pityriasis versicolor. Forster's Neue Notizen aus dem Gebiete der Natur - und Heilkunde 853, 270 - 271, 1846

El-Gothamy, Z., Abdal-Fattah, A.: Tinea versicolor hypopigmentation: histochemical and therapeutic studies (Int. J. Derm., 14, 510-515, 1975)

El-Hefnawi, H., El-Gothamy, Z., Refai, M.: Studies on pityriasis versicolor in Egypt. Clinical and therapeutic. Mykosen 14: 483-490, 1971

Ellinger, F.: Kapitel 1: Photobiologische Wirkungen an der Zelle (S. 5 - 9), In: Die biologischen Grundlagen der Strahlenbehandlung (Urban und Schwarzenberg 1935)

Faergemann, J., Fredriksson, T.: Age incidence of *Pityrosporum orbiculare* on human skin (Acta Derm. Venerol. 60: 531 - 533, 1980)

Faergemann, J.: Antibodies to *Pityrosporum orbiculare* in patients with tinea versicolor and controls of various ages (J. Invest. Dermatol. 80: 133 - 135, 1983)

Faergemann, J., Larkö, O.: The Effect of UV-light on Human Skin Microorganisms (Acta Derm Venereol. Stockh., 67:69-72, 1986)

Fitzpatrick, T. B., Eisen, A. Z., Wolff, K., Friedberg, I. M., Austen, K. F.: Kap: 130: Photophysics, Photochemistry and Photobiology (Kochevar, I.E.; Pathak, M.A.; Parrish, J.A.) (S. 1627 - 1638), Kap: 133: Acute Effects of Ultraviolet Radiation on the skin - protective Agents In: Fitzpatrick, T.B. (Hrsg.): Dermatology in General Medicine Vol.1. Mc Graw-Hill, New York (1993)

Gerber, D., Mathews-Roth, M., Fahlund, C., Hummell, D., Rosner, B.: Effect of frequent sun exposure on bacterial colonization of skin (Int. J. Dermatol. 18: 571-574, 1979)

Götz, H.: Pityriasis versicolor. In: Die Pilzkrankheiten der Haut durch Dermatophyten. Handbuch für Haut- und Geschlechtskrankheiten, Springer Verlag, 352-360, 1962

Gonzales-Ochoa, A.: Pityriasis versicolor. Rev. Med. (Merx) 2: 81-82, 1956

Gordon, M. A.: The lipophilic mycoflora of the skin. In vitro culture of *Pityrosporum orbiculare* n. sp. (Mycologia 43: 524 - 535, 1951)

Gueho, E., Meyer, S. A.: A re - evaluation of the genus *Malassezia* by means of genome comparison (Antonie van Leeuwenhoek 55: 245 - 251, 1989)

Gueho, E., Midgley, G., Guillot, J.: The genus *Malassezia* with description of four new species (Antonie van Leeuwenhoek 69: 337 - 355, 1996)

Guillot, J., Gueho, E.: The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons (Antonie van Leeuwenhoek 67: 297 - 314, 1995)

Hay, R. J., Roberts, S. O. B., Mackenzie, D. W. R.: Pityriasis versicolor, (S. 1176-1178), In: Textbook of Dermatology (Rook, A. J., Wilkinson, D. S., Ebling, F. J. G., eds) Vol. 2. 5th edn., Oxford: Blackwell, 1992

Hoog, G. S. de, Guarro, J.: Atlas of clinical fungi., 1. Ed., Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands (1995)

Ingham, E. Cunningham, A. C.: *Malassezia furfur* (J. Vet. Med. Mycol. 31: 265 - 288, 1993)

Jeliffe, D.B., Jacobson, F.W.: The clinical picture of tinea versicolor in negro infants. (J. Trop. Med. Hyg. 57: 290-293, 1955)

Jung, E.G., Bohnert, E.: Mechanism of depigmentation on pityriasis versicolor alba (Pva). Derm. Res. 256: 333-334, 1976

Kinbara, T., Saito, T., Kano, C., Kobayashi, H.: Microscopical survey of *Pityrosporum* flora clinically normal skin. Jap. J. Med. Mycol. 21: 151-156, 1980

Kistiakowsky, E.V.: Pityriasis versicolor and ultraviolet rays. (Arch. Derm. Syph. 15: 685-689, 1927)

Kreger-Van Rij; N.J.W., Veenhuis, M.: An electron microscope study of the yeast *Pityrosporum ovale*. Arch. Mikrobiol. 123-131, 1970

Kwon - Chung, K. J., Bennett, J. E.: Medical Mycology. Lea & Febiger, Philadelphia. Pp. 170 - 182 (1992)

Labows, J.N., Mc Ginley, K.J., Leyden, J.J.: Characteristic gamma-lactone odor production of the Genus *Pityrosporum*. Appl. Environm. Microbiol. 38:412-415, 1975

Liappis, N., Kochbeck, E., Eckhardt, G. et al.: Aminosäureverluste im menschlichen Schweiß (Arch. Dermatol. Res. 269: 311-323, 1980)

Leeming, J. P., Notman, F.H.: Improved methods for isolation and enumeration of *Malassezia furfur* from human skin (J. Appl. Bacteriol. 25: 2017 - 2019, 1987)

Lehninger, A. L.: Kapitel 5: Aminosäuren und Peptide, (S. 105 - 135) In: Lehninger, A. L., (Hrsg.): Prinzipien der Biochemie. 2. Auflage. De Gruyter Verlag, Berlin, New York. (1992)

Lewis, G. M., Hopper, M. E.: Pseudo-Achromia of Tinea versicolor. (Arch. Derm. Syph. 34: 850-861, 1936)

Lockshin, N.A.: Tinea versicolor masquerading as vitiligo. Cutis 12: 245-247, 1973

Lutz, A.: Korrespondenz. Honolulu, September 1891. (MH. Prakt. Dermatol. 14: 152-155, 1892)

Macher, E., Kolde, G., Bröcker, E. B.: Prophylaxe - Lichtschutz (Schauder, S.) (S. 187 - 217) In: Macher, E.; Kolde, G.; Bröcker, E. B.; (Hrsg.): Jahrbuch der Dermatologie "Licht und Haut". Biermann-Verlag, Münster,(1992)

Malassez, L.: Note sur le champignon du pityriasis simple (Arch. De. Physiol. 2, 1: 203 - 212; 451 - 464, 1874)

Marcon, M.J., Powell, D. A.: Epidemiology, diagnosis and management of *M. furfur* systemic infections. (Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 7: 161-75, 1987)

Marples, M. J.: The genus *Pityrosporum* In:(The Ecology of the human skin Springfield: C. C. Thomas, pp. 408-422, 1965)

Mayser, P., Haze, P., Papavassilis, C., et al: Differentiation of *Malassezia spp.* -selectivity of cremophor El, castor oil and ricinoleic acid for *Malassezia furfur*. (Br. J. Dermatol. 137: 208-213, 1997)

Mayser, P., Imkampe, A., Winkeler, M., Papavassilis, C.: Growth requirements and nitrogen metabolism of *Malassezia furfur* (Arch. Dermatol. Res. 290:277-282,1998)

Mayser P., Pape B.: Decreased susceptibility of *M. furfur* to UV light by synthesis of Tryptophane derivatives. (Antonie van Leeuwenhoek 73: 315-319,1998)

Mayser, P. Pickel, M., Haze, P. et al.: Different Utilization of neutral lipids by *Malassezia furfur* and *Malassezia sympodialis*. (Br.J. Derm. 137:208-213,1997)

Mayser, P., Wille, G., Imkampe, A. et al.: Tryptophane metabolism of *Malassezia furfur*: ist importance in the pathophysiology of pityriasis versicolor. (Mycoses 41, 265-271, 1998)

Mc Ginley, K.J., Leyden, L. J., Marples, R. R., Kligman, A. M.: Quantitative microbiology of the scalp in non - dandruff, dandruff and seborrheic dermatitis (J. Invest. Dermatol. 64: 401 - 405, 1975)

Mc Menamy, R. H., Oncley, J. L.: The specific binding of L-Tryptophan to Serum Albumin (J. Biol. Chem. 233: 1436-1447, 1958)

Meinhof, W., Braun-Falco, O.: Über lipotrophe Hefen auf der menschlichen Haut und deren Bedarf an bestimmten Fettsäuren. Fette Seifen Anstrichmittel 69: 861-4, 1967

Meyer, A. E., Seitz, E. O.: Kapitel 2: Erzeugung von UV-Strahlen S. 12-91; Kapitel 3: Messung der UV-Strahlen S. 91- 207 (F) Durchführung von versch. Spektralmessungen: S. 156-187; Kapitel 4: Physikal., biologische und photochemische Wirkungen der UV-Strahlen und ihre Anwendung S. 208-383 (B) Biologische Grundwirkungen der UV-

Strahlung S.223-227 (D) Biolog. Wirkungen der UV-Strahlen und ihre Anwendung in der Medizin S. 253-271 In: Dr. Phil. Meyer, A.E.; Dr. Phil. Seitz, Ernst Otto; (Hrsg.): Ultraviolette Strahlen. Ihre Erzeugung, Messung und Anwendung in Medizin, Biologie und Technik. 2. Auflage. Walter De Gryter & Co. Verlagsbuchhandlung, Berlin (1949)

Michalowski, R., Rodziewicz,H.: Pityriasis versicolor in the aged. Brit. J. derm. 77: 388-390, 1965

Mittag, H.: Fine - structural investigation of *Malassezia furfur* 2. The envelope of the yeast cells (Mycoses 38: 13 - 21, 1995)

Moschella, Hurley: Kapitel 22: Photosensitivity (Deleo, Vincent, A., Maso, Martha J.) (S. 507 - 533), Kapitel 38: The superficial and subcutaneous Mycoses (Elgart, M. L., Warren, N. G.) (S.869 - 912), In: Moschella; Hurley; (Hrsg.): Dermatology. 3. Auflage. Band 3., W. B. Saunders Company, Philadelphia, (1992)

Nia, A.K., Smith, E.L.: Pityriasis versicolor of the glans penis. (Brit. J. Vener. Dis. 55: 230, 1979)

Nazzaro Porro, M., Passi, S., Caprilli, F., Mercantini, R.: Induction of hyphae in cultures of *Pityrosporum* by cholesterol and cholesterol esters (J. Invest. Dermatol. 69: 531 - 534, 1977)

Nazzaro Porro, M., Passi, S.,: Identification of tyrosinase inhibitors in cultures of *Pityrosporum* (J. Invest. Dermatol. 71: 205 - 208, 1978)

Noble, W. C., : Microbiology of Human Skin. London: Lloyd-Duke.(Pp. 3-65; 263-268, 1981)

Oguchi, M.: Electron microscopic studies of melanocytes in the affected skin of tinea versicolor (Acta. Dermatol. Kyoto 77: 187-92, 1982)

Parrish, J. A., Kripke, M. L.: Kapitel 1: Basic Concepts in Photobiology (Kochevar, I. E.) (S. 5 - 21). Kapitel 4: Tissue Optics and Photoimmunology (Anderson, R. R.) (S. 61 - 76) In: Parrish, John A.; Kripke, Margaret L.; Morrison, Warwick L.; (Hrsg.): Photoimmunology. Plenum Medical Book Company, New York and London (1983)

Parrish, J. A., Anderson, R.R., Urbach, F., Pitts, D.: Kapitel 5: Effects of Ultraviolet Radiation on Microorganisms and Animal Cells (S. 85 - 106) In: Parrish, J.A.; Anderson, R. R.; Urbach, F.; Pitts, D.; (Hrsg.): UV-A Biological Effects of Ultraviolet Radiation with Emphasis on Human Responses to Longwave Ultraviolet. John Wiley & Sons. Chichester New York Brisbane Toronto (1981)

Parisis, N., Stratigos, J., Marcelou-Kinti, U., Capetanakis, J.: Pityriasis versicolor in Griechenland und ihre Prädispositionsfaktoren. Hautarzt 28: 589-592, 1977

Polachek, I., Hearing, V. J., Kwon-Chung, K. J.: Biochemical studies on phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans* (J. Bacteriol. 150: 1212-1220, 1982)

Polachek, I., Kwon-Chung, K. J.: Melanogenesis in *Cryptococcus neoformans* (J. Gen. Microbiol. 134: 1037-1041, 1988)

Polak, A.: Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi (Mycoses 33: 215-224, 1990)

Rassner, G.: Kapitel 7.1.: Erkrankungen der Kutis (Rassner, S. 21-23) In: Rassner; (Hrsg.): Dermatologie-Lehrbuch und Atlas, Urban und Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore (1992)

Razack, E.M.A., Thambiah, A.S.: A clinical study pityriasis versicolor in Madras. Sabouraudia 15: 305-311, 1977

Redline, R. W., Dahms, B. B.: *Malassezia* pulmonary vasculitis in an infant on longterm intralipid therapy (N. Engl. J. Med. 305: 1395 - 1398, 1981)

Regan, J. D., Parrish, J.A.: Kapitel 6: Optical Properties of Human Skin (Anderson, R. R., Parrish, J.A.)) (S. 147-194) In: Regan, James D.; Parrish, John A.; (Hrsg.): The Science of Photomedicine. Plenum Press, New York and London (1982)

Rick, W.: Leukozyten, S.35 - 41. In: Rick, W.; (Hrsg.): Klinische Chemie und Mikroskopie. 6. Auflage. Springer-Verlag, Berlin New York (1989)

Rieth, H.: pityriasis alba, eine kosmetisch besonders störende Pilzerkrankung der Haut. Kosmetologie 3: 58-63, 1973

Rivers, J., Norris, P. G., Murphy, G. M. et al.: UVA sunbeds: tanning, photoprotection, acute adverse effects and immunological changes. (Br. J. Dermatol.: 120, 767-777, 1988)

Roberts, S. O. B.: *Pityrosporum orbiculare*: incidence and distribution on clinically normal skin (Br. J. Dermatol. 81: 264 - 269, 1969)

Robin, C.: Histoire naturelle des vegetaux parasites (J B. Baillire, Paris, 1853)

Robins, E.J., Breathnach, A.S., Bennet, D., Picardo, M., : Ultrastructural observations on the effect of azelaic acid on normal human melanocytes and human melanoma cell line in tissue culture. Br. J. Derm. 113: 687-697, 1987

Roed - Petersen, J.: Tinea versicolor and body lotions (Acta. Derm. Venereol 60: 439 - 440, 1980)

Rohde, B.: Dermatologie in Stichworten, (Hamburg, Glaxo GMBH 1987)

Ruete, A. E.: Zur Frage der depigmentierenden Pityriasis versicolor (Derm. Wochenschrift 96: 333-336, 1933)

Sabourand, R.: Maladies du cuir chevelu; 2 Les maladies desquamatives. Masson, Paris, 1904

Sadtler: Standard Spectra UV (14: 3453, 1980)

Schulze, R.: Kapitel 1: Strahlenquellen der Erde.S.1; Kapitel 2: Der Weltraum aus Strahlenquelle-Strahlenwirkungen oberhalb der Atmosphäre.S.2 - 8; Kapitel 5: Kurzer Überblick über Maßsysteme und Bestrahlungsstärken.S.20 - 28; Kapitel 6: Biologische Strahlenwirkungen in der Biosphäre.S.28 - 41; Kapitel 7: Biologisch bedeutsame Strahlen in der Biosphäre - Strahlenmengen.S.41 - 113; Kapitel 8: Biologisch bedeutsame Strahlen in der Biosphäre-spektrale Verteilung.S.113 - 131. In: Prof. Dr. Rudolf Schulze;(Hrsg.): Strahlenklima Der Erde. Dr. Dietrich Steinkopf Verlag, Darmstadt (1970).

Seebacher,C., Blaschke - Hellmessen, R.: Kapitel 5.2.: Mykologische Laboratoriumsdiagnostik (S. 157 - 161) In: Seebacher,C.; Blaschke-Hellmessen, R. (Hrsg.): Für die medizinische Praxis "Mykosen". 1. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Jena. (1990)

Simmons, R. B., Ahearn, D. G.:Cell wall ultrastructure and diazonium blue B reaction of *Sporopachydermia quercum*, *Bullera tsugae*, and *Malassezia* spp. (Mycologia 79: 38-43, 1987)

Simmons, R. B., Gueho, E.: A new species of *Malassezia* (Mycological Research 94: 1146 - 1149, 1990)

Sloof, W.Ch.: Genus *Pityrosporum* Sabouraud. In: The yeasts-A taxonomic Study: North Holland Publishing Company, pp. 1167-1186, 1970

Smith, Kendric, C.: Kapitel 1: The Nature of Light (Grossweiner, L.I.) (S. 2 - 4) In: Smith, Kendric C.; (Hrsg.): The Science of Photobiology. 2.Auflage. Plenum Press, New York and London (1989)

Stryer, L.: Kapitel 2: Struktur und Funktion der Proteine (S. 15 - 28); In: L. Stryer, (Hrsg.): Biochemie. 4. Auflage. Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg. (1987)

Taylor, B. E., Wheeler, M. H., Szaniszlo, P. J.: Evidence for a pentaketide melanin biosynthesis in dematiaceous human pathogenic fungi (Mycologia 79: 320-322, 1987)

Van Abbe, N. J.: The investigation of dandruff (J. Soc. Cosm. Chemists 15: 609 - 630, 1964)

Vanbreusegham, R.: Diagnostic et prevalence du pityriasis versicolor en Afrique. Bull Soc. Franc. Mycol. Med. Trop. 48: 165-166, 1973

Wallace, M., Bagnall, H., Glen, D., Averill, S.: Isolation of lipophilic yeast in "sterile" peritonitis (Lancet ii,956,1979)

Wang, S. Y.: Kapitel 8: Mutation in Ultraviolet Light-Damaged Microorganisms (Doudney, C.O.) (S. 305 - 369) In: Wang, S. Y.; (Hrsg.): Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids. Vol.2. Academic Press, New York (1976)

Wang, Y., Casadevall, A.: Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV-light (Appl. Environ. Microbiol. 60: 3864-3866, 1994)

Wertheim, L.: Über Lichtwirkung und Leukoderma bei Pityriasis versicolor (Dermatol. Zeitschrift 38: 343-354, 1923)

Wikler, J. R., Janssen, N., Bruynzeel, D. P., Nieboer, C.: The Effect of UV-light on *Pityrosporum* Yeasts: Ultrastructural Changes and Inhibition of Growth. (Acta Derm Venerol (Stockh) (1990); 70. S.69-71)

Wolff, H.H., Plewig, G.: Ultrastruktur der Mikroflora in Follikeln und Komedonen. (Hautarzt 27: 432-440, 1976)

Wu, Y. C., Chen, K. T.: Humoral immunity in patients with tinea versicolor (J. Dermatol. 12: 161 - 166, 1985)

Yarrow, D., Ahearn, D. G.: *Malassezia* Baillon., (S.882-885) In: The Yeasts: A taxonomic study (Kreger-van Rij NJW, ed) 3 rd edn., Amsterdam: North Holland Publishing Company, 1984

9. Lebenslauf

| | |
|--|--|
| Name | Birgit, Hildegard, Margarete Pape |
| Adresse / Telefon | Thüringer Weg 72 D 33102 Paderborn Tel. 05251 - 4619 |
| Geburtsdatum | 12. März 1971 |
| Geburtsort | Paderborn in Nordrhein -Westfalen |
| Nationalität | Deutsch |
| Sprachen | Deutsch, Englisch |
| Schul Ausbildung | 1971-1981 St. Bonifatius Grundschule, Paderborn 1981-1990 Pelizaeus-Gymnasium, Paderborn 21.05.1990 Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife |
| Ausbildung zur med. techn. Laboratoriumsassistentin | 1990-1992 Staatl. Anerkannte Lehranstalt für med. techn. Assistentinnen, Braunschweig Abschlussexamen: 11.09.92 |
| Studium der Humanmedizin | 1993 - 2000 Universität Gießen 30.08.1995 Ärztliche Vorprüfung 29.08.1996 Erstes Staatsexamen 09.04.1999 Zweites Staatsexamen 10.05.2000 Drittes Staatsexamen |

Ärztin im Praktikum

Beginn 01.08.2000 Kreiskrankenhaus Hameln

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Priv. Doz. Dr. med. Peter Mayser. Er überließ mir freundlicherweise dieses interessante Dissertationsthema und stand mir bei der Durchführung der Experimente sowie bei der Erstellung dieser Promotionsschrift hilfreich zur Seite.

Danken möchte ich für die Bereitstellung des mykologischen Forschungslabors an der Hautklinik der Justus-Liebig-Universität in Gießen sowie der medizinisch technischen Laboratoriumsassistentin Frau Förste, die stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Weiterhin möchte ich mich auch für die großzügige Bereitstellung finanzieller Mittel der Else-Kröner-Fresenius-Stiftung sowie der Beiersdorf AG und Clariant AG für Material- und Gerätkosten bedanken.

Ebenso möchte ich an dieser Stelle meinen Eltern, Brüdern Ulrich und Michael und Freunden danken. Sie waren mir während der Erstellung dieser Dissertationsschrift eine große menschliche Hilfe und haben durch ihr Zutun auch zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.